

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences
Ecole Doctorale de science de la vie et de la santé

T H E S E

pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences
de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis

présentée et soutenue par
Hussein RAAD

**Rôle et fonctionnalité
des récepteurs gustatifs dans les ailes de drosophiles**

Thèse dirigée par Dr. Alain ROBICHON
soutenue le 25/01/2013

Jury :

M. FERVEUR Jean Francois	DR	Président, examinateur
M. GIURFA Martin	Professeur	Rapporteur
M. VEENSTRA Jan Adrianus	Professeur	Rapporteur
Mme. CAPOVILLA Maria	CR	Examineur

REMERCIEMENTS

Je remercie Dr. Pierre ABAD pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité « Interactions Biotiques et Santé Végétale » de l'INRA à Sophia Antipolis.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Dr. Alain ROBICHON, pour sa direction de mes travaux au sein de l'équipe « Génétique, Environnement et Plasticité », pour son encadrement et ses conseils dans un domaine qui était alors tout nouveau pour moi, pour son humanité, soutien et critiques tout au long de ces trois ans.

Je tiens également à remercier mes rapporteurs et examinateurs : Martin GURFA, Jan Adrianus VEENSTRA, Jean François FERVEUR et Maria CAPOVILLA qui ont accepté de juger mon travail. Merci de m'avoir accordé de votre temps et vos commentaires d'experts.

Un grand merci à Maria CAPOVILLA pour le temps qui t'a passé avec moi, les discussions, les conseils, ta rigueur et ton soutien. Merci.

Je tiens à remercier Dr. Jean François FERVEUR, pour son participation à mon travail, ses idées précieuses.

Je remercie également Sophie TARES et Laury ARTHAUD pour leur aide technique et leurs conseils et tout les personnels de L'INRA pour leur accueil, leur humanité et les beaux moments passés ensemble.

Finalement, j'exprime ma profonde reconnaissance pour toute ma famille et particulièrement ma mère, qui ma soutenue tout au long de ces années.

Abréviations

GRN	Gustatory Receptor Neuron
ORN	Olfactory Receptor Neuron
Gr	Gustatory receptor
Or	Olfactory receptor
OBP	Odorant Binding Protein
LSO	Labral Sense Organ
DSCO	Ventral Ciberial Sense Organ
VSCO	Dorsal Ciberial Sense Organ
SOG	Subesophageal Ganglion
MB	Mushrom body
TR	Taste Receptor
AMPc	cyclic Adenosine Monophosphate
InsP3	Inositol triphosphate
PDE	Phosphodiesterase
JO	Johnston Organ
Md	Multi dendrite
AL	Antennal Lobe
LAL	Larval Antennal Lobe
LEV	Leading Edge Vortex
ACV	Anterior Crossvein
PCV	Posterior Crossvein
HCV	Humoral Crossvein
LV	Longitudinal Vein
UAS	Upstream Activation Sequence

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
SUMMARY	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. Introduction générale	13
2. Système gustatif chez la drosophile	15
2.1. Organes gustatifs	15
2.2. Sensilles gustatifs	17
2.3. Récepteurs gustatifs	18
2.4. Projections du système gustatif chez l'adulte	21
2.5. Projections du système gustatif chez la larve	23
2.6. Transduction du signal.....	23
2.7. Expression atypique des récepteurs gustatifs	26
3. Systèmes olfactifs chez la drosophile	27
3.1. Organes olfactifs.....	27
3.2. Sensilles Olfactifs	29
3.3. Récepteurs Olfactif	30
3.4. Odorant Binding Proteines	31
3.5. Projections axonales du système olfactif.....	32
4. Aile de drosophile	34
5. Leading edge vortex.....	36
OBJECTIFS	39
MATERIELS ET METHODE.....	43
1. Élevage.....	44
2. Prélèvement des individus et croisements	44
3. Les différentes lignées de drosophiles utilisées	44
4. Système UAS-GAL4	45
5. Senseur de calcium	46
6. Test de comportement (trajectometrie).....	48
a. Souches utilisés	48
b. Dispositif	48
7. Test de choix	50

8. Liste des sucres et précurseurs glycosidiques utilisés.....	51
Sucres.....	51
Précurseurs glycosidiques.....	52
9. Amorces utilisées pour l'RT-PCR	53
RESULTATS	59
Functional gustatory receptors in <i>Drosophila</i> wings and their role in flight-associated chemoperception	60
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	118
1. Résultats test de comportement (trajectométrie).....	119
Distance parcourue	119
Distance moyenne.....	120
Temps passé dans la zone I.....	120
Vélocité.....	121
Mobilité/immobilité.....	121
2. Test de toxicité.....	123
3. Test de pulvérisation	124
DISCUSSION	125
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	130
REFERENCE.....	132

RÉSUMÉ

Les capacités cognitives pour assurer l'exploration et la découverte de nouvelles niches écologiques sont au cœur des processus d'adaptation et de survie des espèces vertébrés et invertébrés. A cet égard, les systèmes neuronaux chimiosensoriels composés des organes olfactifs et gustatifs permettent le guidage et repérage des sources de nourritures et/ou des partenaires sexuels. Un fait marquant chez les insectes et en particulier la drosophile réside dans le fait que les organes gustatifs sont disséminés sur le corps. La bordure antérieure de l'aile est tapissée avec des sensilles gustatives alternées avec des sensilles mécaniques. La fonctionnalité et le rôle des cellules gustatives au niveau de l'aile de la drosophile reste énigmatique et à ce jour largement inconnue (Stocker, 1994). Notre travail a consisté à explorer la signalisation et le mécanisme de transduction de ces récepteurs et à questionner leur importance dans l'adaptation des insectes à leur écosystème. Nos résultats portent sur trois volets. Nous avons vérifié que l'expression des récepteurs du goût est effective dans les ailes des trois insectes différents (drosophiles, pucerons et abeilles) par RT-PCR. Nous avons ensuite étudié la fonctionnalité de ces récepteurs vis-à-vis des molécules sucrées et amères à l'aide d'une souche transgénique (G-CaMP), qui exhibe une forte fluorescence provoquée par des pics de calcium cytosolique. Enfin, des tests comportementaux ont été réalisés avec une souche transgénique (Poxn*) dans laquelle les sensilles chimiosensorielles de l'aile sont spécifiquement invalidés sans altérer les autres structures olfactives et/ou gustatives. Les résultats montrent un effet significatif des cellules chimiosensorielles de l'aile quant à l'orientation dans l'espace et à l'apprentissage Bayésien. Nos résultats sur ces trois volets nous ont permis d'élaborer des hypothèses au regard de l'évolution neuroanatomique de l'aile des insectes depuis les organismes ancestraux d'origine marine desquels ils dérivent. Des experts en aérodynamique proposent la création d'un vortex durant le vol qui forme une spirale de courant d'air le long de la bordure antérieure de l'aile. La parfaite superposition entre ce vortex et le nerf costal de l'aile nous permet de déduire que les vibrations de l'aile entre 50 et 1.000 Hertz chez les insectes sont en mesure de nébuliser des matériaux (micro poussières, micro gouttelettes, molécules faiblement volatiles) lesquels vont être captés/entraînés dans le vortex et adressés aux sensilles gustatives. Notre hypothèse est que ce mécanisme permettrait aux insectes pollinisateurs de goûter les fleurs sans s'y poser et sans mettre à contribution leur trompe buccale (*proboscis*). Ce scénario permettrait de dissocier le goût de l'ingestion digestive en évitant les empoisonnements par des molécules toxiques émises

par les plantes et d'autre part il rendrait l'exploration plus efficace, en minimisant le temps de recherche.

SUMMARY

Cognitive capacities used to ensure the exploration and discovery of new ecological niches are at the heart of the process of adaptation and survival of vertebrate and invertebrate species. In this respect, the neural chemosensory systems, composed of the olfactory and gustatory organs, allow the guidance and finding of food sources and/or sexual partners. A striking feature in insects and particularly in *Drosophila* is that gustatory organs are disseminated in the body. The anterior margin of the wing is lined with gustatory sensilla alternated with mechanosensory sensilla. The function of gustatory cells in the wing of *Drosophila* remains enigmatic and actually quite unknown (Stocker, 1994). Our work consisted in exploring the signaling and the transduction mechanisms of these receptors and in questioning their importance in the adaptation of insects to their ecosystem. Our results are based on three components. We have verified that the expression of gustatory receptors occurs in the wings of three different insects (*Drosophila*, aphid and honey bee) by RT-PCR. We have studied the function of these receptors *vis-à-vis* of sweet and bitter molecules using a transgenic line (G-CaMP) that exhibits a strong fluorescence provoked by cytosolic calcium picks. Finally, behavioral assays have been realized with a transgenic line (Poxn*) in which the chemosensory sensilla have been invalidated without altering the other olfactory and gustatory structures. Our results show a significant effect of wing chemosensory cells as far as orientation in space and Bayesian learning and have permitted us to elaborate hypothesis regarding the neuroanatomical evolution of the wing of insects since ancestral organisms of marine origin from which they derive. Experts in aerodynamics propose the creation of a vortex during flight that forms a spiral of air along the anterior border of the wing. The perfect superposition between this vortex and the costal nerve of the wing allows us to deduce that the vibrations of the insect wing between 50 and 1.000 Hertz are able to nebulize materials (microdust, microdrops, weakly volatile molecules), which are captured/trapped in the vortex and addressed to the gustatory sensilla. Our hypothesis is that this mechanism would let pollinator insects taste flowers without landing and without involving the proboscis. In this scenario insects would dissociate taste from ingestion, avoiding poisoning by toxic molecules emitted by plants and rendering exploration more efficient by minimizing searching time.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction générale

L'évolution des êtres vivants durant des millions d'années a été affectée et contrôlée soit par des événements brusques et instantanés soit par des changements progressifs et lents qui ont affectés les milieux d'habitation, les sources de nourriture et l'environnement. Ces événements ont conduit au développement des systèmes de communication sophistiqués, diversifiés, interconnectés et différents selon les espèces. Parmi ceux-ci, le système chimio-sensoriel permet aux insectes de détecter et discriminer les molécules chimiques dans l'environnement (voir figure 1). Ce système se décompose en deux parties: le système olfactif pour la détection des molécules volatiles et le système gustatif pour la détection des molécules solubles. Le système gustatif est composé de *Gustatory Receptor Neurons* (GRNs) qui expriment des récepteurs gustatifs (Grs) au niveau des membranes de leurs dendrites. Ces dendrites baignent dans l'hémolymph à l'intérieur d'un poil percé appelé sensille gustative.

Les marges antérieures des ailes des insectes sont équipées de cellules mécano- et chimio-sensorielles. Elles comprennent une trentaine de sensilles gustatives contenant chacune quatre GRNs. La fonction de ces récepteurs gustatifs reste énigmatique. Stoker (Stocker, 1994) a émis l'hypothèse d'un rôle de ces sensilles dans les fonctions comme le nettoyage. Plus récemment, il a été démontré que le gène *foraging* (*for*), qui est impliqué dans le comportement d'exploration chez la larve et l'adulte, intervient dans la neurogenèse de l'aile, laissant imaginer un rôle de ces récepteurs gustatifs pour faciliter la dispersion et l'exploration des espaces (Ben Rokia-Mille et al., 2008).

La gustation chez les insectes reste mal comprise à cause de certaines difficultés liées à son étude. En effet, bien que les GRNs de la drosophile soient assez bien caractérisés, les mécanismes de transduction des récepteurs gustatifs sont controversés.

Le but de mon projet de thèse est de comprendre le rôle et les fonctions de ces organes gustatifs au niveau de l'aile des insectes et pourquoi l'évolution a privilégié ce système neuronal de détection des molécules sapides pour appréhender l'environnement.

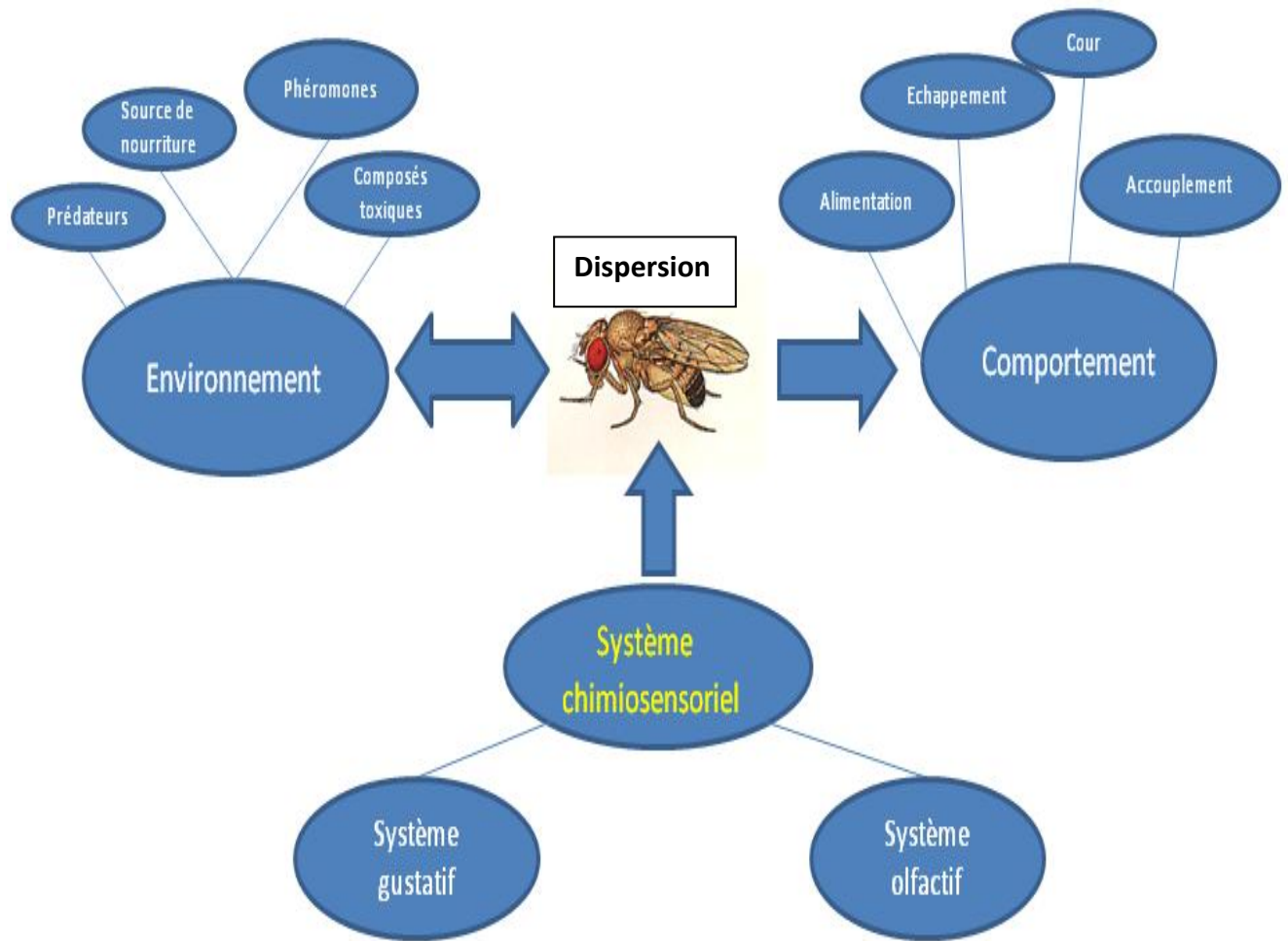


Figure 1. Schéma résumant l'interaction entre la drosophile et son environnement médiatisée par ses systèmes gustatif et olfactif.

2. Système gustatif chez la drosophile

2.1. Organes gustatifs

L'organisation du système gustatif chez les insectes diverge de celle des mammifères. Au contraire de ces derniers pour lesquels le goût est restreint à un seul organe, le système gustatif chez les insectes est disséminé sur plusieurs zones du corps (*proboscis*, pattes, bordure extérieure des ailes et ovipositeur) décrits ci-dessus (Figure 2). La sensille est l'organe de structure de base de ce système sensoriel.

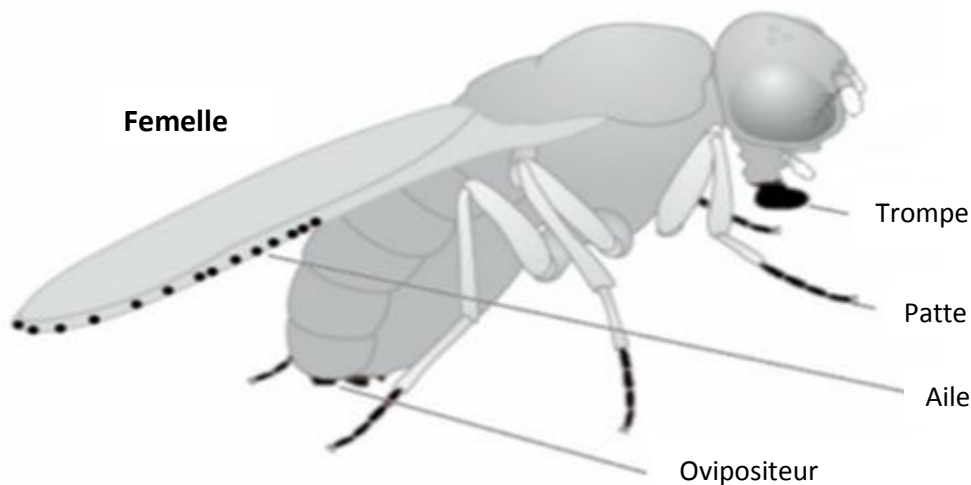


Figure 2. *Distribution des organes gustatifs sur le corps de la drosophile* (Silbering and Benton, 2010), La couleur noire représente les positions des sensilles gustatives.

2.1.1. **Proboscis (trompe):** organe principal du goût chez la drosophile, il est l'équivalent de la langue chez l'humain. Cet organe contient deux structures gustatives distinctes: la première est constituée de sensilles localisées sur la partie externe (*labellum*), permettant à la drosophile l'évaluation de la qualité de nourriture avant l'ingestion; la seconde est située dans la cavité buccale et comprend des sensilles gustatives internes organisées en trois organes (Figure 3). Ceux-ci sont l'organe sensoriel labral (LSO), et les organes sensoriels cibariaux ventraux et dorsaux

(VCSO et DSCO) (Figure 3). Le *labellum* comprend deux zones présentant 31 sensilles gustatives chacune. Par ailleurs, on distingue trois types de sensilles dont les poils correspondants varient en taille: les courtes (S), les longues (L) et les intermédiaires (I). Les S et les L possèdent 4 GRNs alors que les I n'en possèdent que deux. Les sensilles S et L contiennent chacune un neurone sensible au sucre (les cellules S), un neurone sensible à l'amère (les cellules L2), un neurone sensible à la faible concentration saline (les cellules L1) et un sensible à la faible osmolarité (les cellules W). Les sensilles I renferment un neurone sensible au sucre et un autre sensible à la faible concentration saline et à l'amère (Hiroi et al., 2004). Le LSO comprend neuf sensilles dans chacun des deux « spots » symétriques (Gendre et al., 2004), le VSCO, trois sensilles et le DSCO, deux sensilles (Gendre et al., 2004).

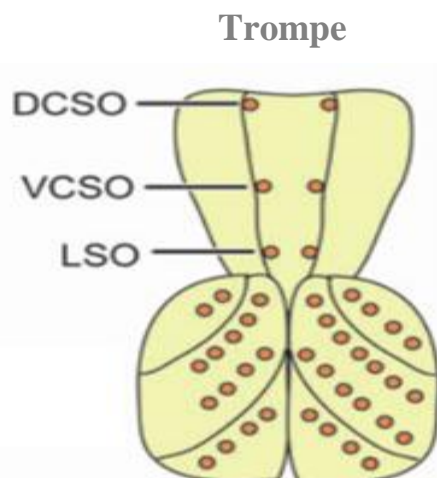


Figure 3. Représentation graphique de la trompe. LSO : Organe Sensoriel Labral. VCSO et DSCO : Organes Sensoriels Cibariaux Ventrals et Dorsaux (modifié de Vosshall and Stocker, 2007).

2.1.2. **Pattes:** les pattes antérieures des males sont recouvertes d'environ 50 sensilles gustatives alors que celles des femelles n'en possèdent qu'environ 37 (Mitchell, 1999). Ce dimorphisme sexuel est causé par la présence des sensilles spécialisées chez le male, dont la fonction est de détecter les phéromones émises par les femelles (Bray and Amrein, 2003). Les sensilles gustatives sont au nombre de 30 pour les

- pattes du second rang et 32 pour celles du troisième rang, indistinctement pour les deux sexes. Chaque sensille y abrite de 2 à 4 GRNs.
- 2.1.3. **Ovipositeur** : les femelles possèdent sur leur partie génitale 10 sensilles gustatives, qui jouent probablement un rôle important dans le choix des endroits de dépôt des œufs (oviposition) et le réflexe de ponte (Montell, 2009).
- 2.1.4. **Ailes** : la bordure de l'aile est décorée avec 30 sensilles gustatives essentiellement sur la partie dorsale de la veine costale antérieure. La face ventrale contient 12 autres sensilles gustatives intercalées par des sensilles mécano-sensorielles (Mitchell, 1999).

2.2. Sensilles gustatives

2.2.1. Les sensilles du goût type trichodea (taste bristles)

Chaque sensille contient entre 7 et 9 cellules dont 2 à 4 neurones gustatifs, 1 neurone mécanosensoriel et 3 cellules non neuronales accessoires (une cellule trichogène, une cellule tormogène et une cellule thocogène) (Figure 4). Chaque neurone gustatif projette une dendrite vers le sommet du poil au niveau de l'ouverture (pore) et de l'autre côté il projette son axone vers les ganglions thoraciques (Figures 5).

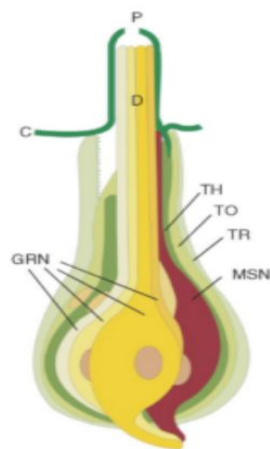


Figure 4. Structure de la sensille gustative (Amrein and Thorne, 2005). Elle contient quatre GRNs dont les dendrites sont en contact avec le pore terminal (P). Trois cellules accessoires, Thecogène (TH), Tormogène (TO), Trichogène (TR) et un neurone mécano-sensoriel (MSN) sont co-présentes avec les GRNs.

2.2.2. Les sensilles du goût type « taste pegs »

Il existe environ 35 sensilles de ce type chez la drosophile constituées chacune d'un neurone gustatif et d'un neurone mécanosensoriel. Ces organes gustatifs sont alignés le long des rainures du *labellum* et font donc partie du dispositif contrôle pour évaluer les liquides avant leur aspiration dans le tube digestif (de Bruyne and Warr, 2006) (Figure 5).

2.2.3. Sensille sans poil (*Hairless sensille*)

Ces sensilles sont présentes dans la cavité buccale. Elle contiennent 4 neurones sensoriels qui rentrent en contact avec la nourriture avant qu'elle ne soit ingérée dans l'œsophage (de Bruyne and Warr, 2006) (Figure 5).

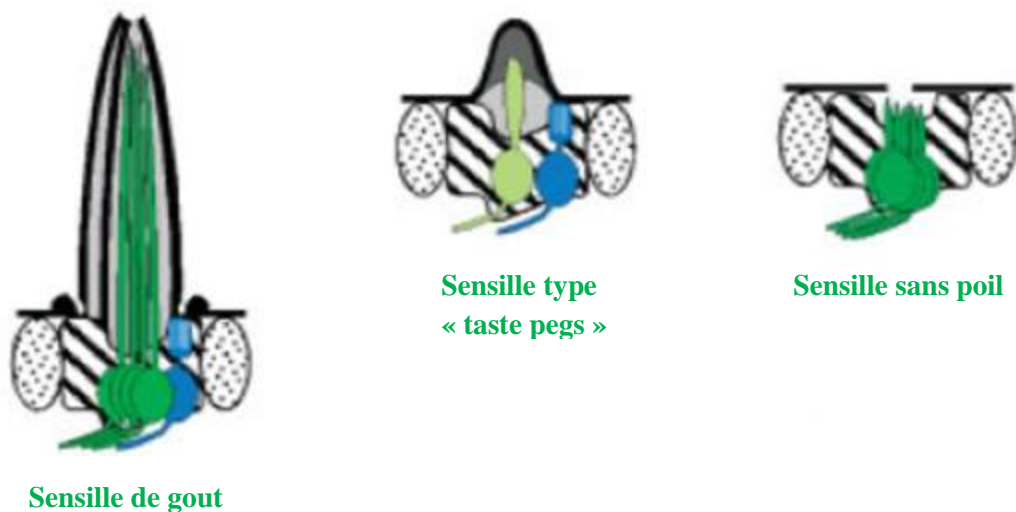


Figure 5. Les différentes morphologies de sensilles gustatives. Sensille trichodea associée à un poil long, sensille type « taste pegs » et sensille sans poil. Les GRNs sont en vert et le neurone mecano-sensoriel en bleu. (de Bruyne and Warr, 2006).

2.3. Récepteurs gustatifs

Les récepteurs gustatifs ont été identifiés grâce à des méthodes de bio-informatiques, des méthodes d'hybridation *in situ* des ARNs et finalement par des constructions génétiques utilisant le système UAS-GAL4 (Clyne et al., 2000; Dunipace et al., 2001; Scott et al., 2001). Cette famille de gènes est composée de 60 gènes encodant un catalogue de protéines différentes par la séquence et la fonction. L'homologie entre deux Grs est de 15-25 % en moyenne (Clyne et al.,

2000). Chaque gène de cette famille encode une protéine de sept domaines transmembranaires, de 350 à 550 acides aminés. Des études fonctionnelles ont permis la classification de cinq types des récepteurs gustatifs: récepteurs aux sucres, récepteurs aux molécules amères, récepteurs au CO₂, récepteurs à l'eau (faible osmolarité) et récepteurs aux phéromones.

2.3.1. Récepteurs des sucres

Le premier récepteur gustatif identifié comme étant un récepteur de sucre est le Gr5a, responsable de la réponse au tréhalose (Dahanukar et al., 2001) (Ueno et al., 2001). Des études d'électrophysiologie et de comportement ont montrés que l'invalidation de Gr5a n'affecte pas la réponse des GRNs *vis-à-vis* des autres sucres. Par contre l'ablation des cellules neuronales gustatives de types « S » affecte la réponse à tous les sucres. Ceci montre qu'un seul neurone peut exprimer différents récepteurs de sucres.

Un autre groupe de récepteurs a été identifié après invalidation des homologues du gène Gr5a, à savoir les gènes Gr64a, Gr64b, Gr64c, Gr64d, Gr64e et Gr64f (Figure 6). Au contraire de Gr5a, l'invalidation des gènes du groupe Gr64 (a-f) conduit à une perte de sensibilité pour plusieurs sucres dont le sucrose et le maltose. Il a été montré également que Gr64a est essentiel pour la détection de plusieurs sucres incluant sucrose, glucose et maltose (Dahanukar et al., 2007; Jiao et al., 2007). Des études récentes montrent que Gr64f est un co-récepteur impliqué dans la détection de la pluparts des sucres, ce qui suggère fortement que les Grs fonctionnent comme des hétéro-dimères ou multimères (Jiao et al., 2008).

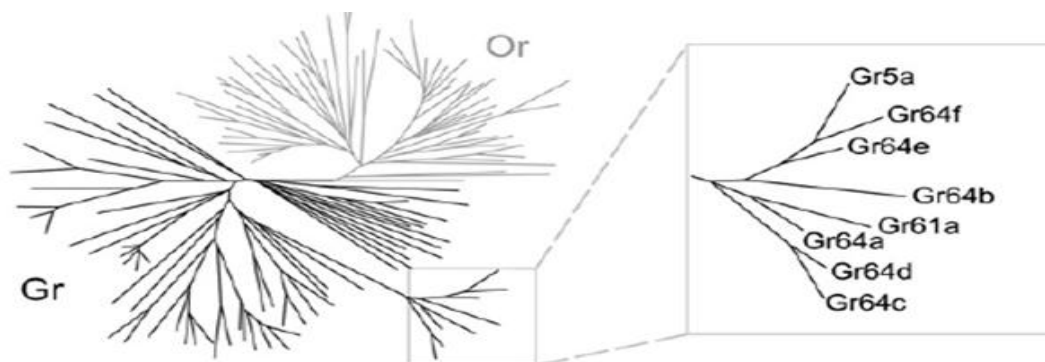


Figure 6. Arbre phylogénétique représentant la famille de chimio-récepteurs chez la *drosophile*. Récepteurs olfactifs en gris et récepteurs gustatifs en noir. L'agrandissement montre la sous-famille de Gr5a (modifié de Dahanukar et al., 2007)

2.3.2. Récepteurs des molécules amères

Les récepteurs des molécules amères sont exprimés au niveau des neurones de la sensille gustative de type L2. Des études effectuées par Moon *et al.* (2006), ont montrés que Gr66a est indispensable pour la réponse à la caféine. Des études récentes montrent qu'un autre récepteur (GR33a) répond également à la détection de la caféine. L'invalidation du récepteur Gr93a donne un phénotype comparable à l'invalidation de Gr66a (Jiao *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Tous ces résultats convergent pour émettre l'hypothèse que ces molécules fonctionnent dans une configuration di- ou multi-mériques.

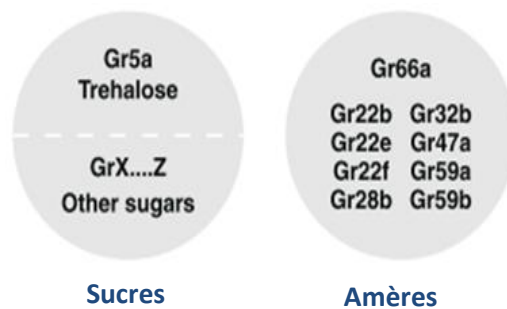


Figure 7. Récepteurs gustatifs chez les drosophiles. Les neurones gustatifs des sucres expriment Gr5a reponsable de la perception de tréhalose et des Grs pour la perception d'autres sucres. Les neurones gustatifs des molécules amères expriment Gr66a en plus d'une combinaison d'autres Grs (modifié de Vosshall and Stocker, 2007).

2.3.3. Récepteurs des phéromones

Le comportement sexuel des mâles et des femelles est influencé par les phéromones. Gr68a est exprimé dans des neurones spécifiques au niveau des pattes antérieures des mâles et est reconnu comme un récepteur aux phéromones. L'inactivation du gène GR68a aboutit à une réduction de la performance de cour nuptiale du mâle (Bray and Amrein, 2003). Un deuxième candidat, Gr32a, est aussi impliqué dans la reconnaissance phéromonale (Miyamoto and Amrein, 2008). Récemment une famille des récepteurs a été decrite (famille de gènes PPKs Flybase). Cette famille constitue une nouvelle classe de récepteurs aux pheromones (Thistle *et al.*, 2012).

2.3.4. Récepteurs du CO₂

Des études ont montrés que Gr21a est indispensable pour la détection du CO₂ (Jones et al., 2007). D'autres auteurs (Kwon et al., 2007) ont montré que les neurones dans lesquels Gr21a et Gr63a sont ectopiquement exprimés deviennent sensibles au CO₂.

2.3.5. Récepteurs à l'eau

La plupart de sensilles gustatives contiennent quatre neurones gustatifs et un neurone mécanosensoriel. Parmi ces quatre neurones on trouve un neurone « W » qui est sensible aux faibles osmolarités. Des auteurs (Meunier et al., 2009) ont montré que la réponse du neurone « W » peut être inactivée par blocage pharmacologique des canaux calciques. Cela suggère que ces senseurs d'osmolarité sont liés à des courants ioniques. Récemment, des études ont montré que le gène PPK28 (membre d'une famille de canaux sodiques) confère la sensibilité à l'osmolarité et contrôle la réponse cellulaire et comportementale liée à la perception de l'eau (Cameron et al., 2010). Ce mécanisme de détection des faibles osmolarités par le PPK28 semble important pour l'appréciation des sources d'eau externe mais les mécanismes moléculaires liés à la perception de l'eau sont encore incertains.

2.4. Projections du système gustatif chez l'adulte

Les axones des GRNs ciblent le Ganglion Subesophageal (SOG) qui est localisé dans la région ventrale du cerveau (Singh, 1997). Les signaux gustatifs du *labellum*, pharynx et pattes se propagent le long des axones et se projettent dans des zones distinctes du SOG, d'où l'existence d'une carte des différents organes gustatifs dans le cerveau de drosophile (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004). Les organes gustatifs internes sont représentés dans la partie antero-dorsale du SOG, cependant les GRNs de la trompe et des pattes ciblent la partie centrale et postérieure du SOG. Ces GRNs, distincts entre eux en fonction de l'organe d'origine peuvent exprimer les mêmes GRs, ce qui indique que le même récepteur peut être associé à des fonctions et des comportements différents, dépendants du site de la stimulation (Dethier and Goldrich-Rachman, 1976). L'activation des GRNs au niveau de l'ovipositeur induit la ponte des œufs tandis que

l'activation des GRNs des pattes (*tarsal segment*) induit l'extension réflexe de la trompe et l'ingestion consécutive de nourriture.

De plus, les axones des neurones exprimant des récepteurs de molécules sucrées se projettent d'une façon isolatérale au niveau du SOG. Par contre, les axones de neurones exprimant des récepteurs des molécules amères se projettent dans la partie médiane du SOG (Figure 8) (Thorne et al., 2004) (Wang et al., 2004). Ces données montrent l'existence d'une 2^{ème} carte spatiale illustrant cette fois l'activité gustative spécifique des molécules sapides au niveau du SOG.

Il existe également deux types d'interneurones dans le SOG qui répondent soit aux sucres soit aux molécules amères et qui contrôlent respectivement le comportement d'attraction ou de répulsion,. D'autres interneurones transmettent l'information au *Mushrom Body* (MB) en vue du guidage comportemental de l'insecte (Vosshall and Stocker, 2007).

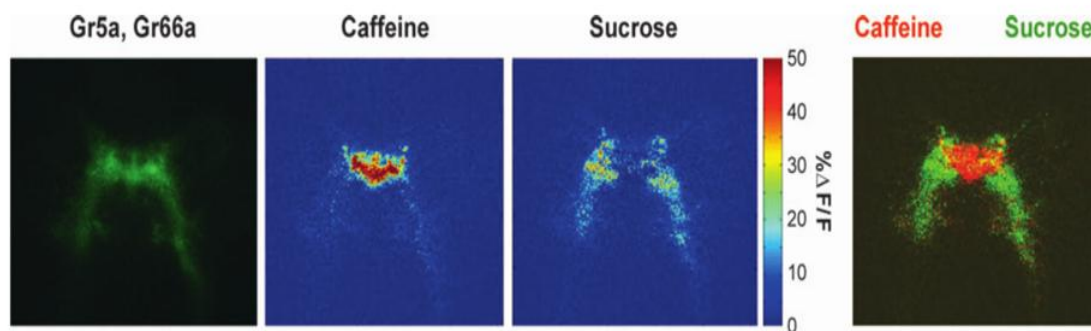


Figure 8. Carte de la distribution du goût dans le SOG de la drosophile. Le changement d'intensité de fluorescence permet la mesure des pics de calcium après la formation d'un complexe calcium/GFP modifié (G-CaMP) dans les neurones exprimant Gr5a (sucre) et Gr66a (molécules amères). La représentation montre une ségrégation des deux réponses. La première image à gauche montre la fluorescence initiale de G-CaMP. Les 2^{ème} et 3^{ème} montrent l'augmentation d'intensité de la fluorescence ($\Delta F/F$ %) après traitement avec 100 mM caféine et 1 M glucose, respectivement. La 4^{ème} est une superposition de la fluorescence induite par la caféine en rouge et celle induite par le sucrose en vert (modifié de Vosshall and Stocker, 2007).

2.5. Projections du système gustatif chez la larve

Des études menées par Colomb *et al.* (2007) ont montrés l'existence de quatre régions du SOG chez la larve dans lesquelles les neurones des GRNs se projettent. Les projections neuronales et connections avec les interneurons sont organisées chez la larve de la même façon que chez l'adulte bien qu'un nombre réduit de cellules soit mis en jeu.

2.6. Transduction du signal

2.6.1. Transduction du signal chimio-sensoriel chez les mammifères.

Les récepteurs gustatifs chez les mammifères (TRs) sont des récepteurs couplés aux protéines G. Le mécanisme de transduction du signal est différent selon les ligands (sucres, molécules amères).

2.6.1.1. Transduction des sucres et acides aminés

Les sucres et les acides aminés activent une famille de récepteurs couplés aux protéines G qui activent divers isoformes de cyclase et/ou phospholipase C. Les neurones gustatifs spécialisés pour les sucres et les acides aminés activent donc la voie de l'AMP cyclique et/ou la voie des Ins(1,4,5)P3 (Kinnamon, 2000; Lindemann, 2001; Kinnamon, 2012). Une élévation du niveau du calcium cytosolique s'ensuit. Dans la voie d'AMPC, le calcium vient du milieu extracellulaire, dans la voie de l'Ins(1,4,5)P3, le calcium vient des organelles de stockage de calcium interne. Dans les deux cas, la résultante est une inhibition de la conductance du K^+ provoquant la dépolarisation membranaire (Kinnamon, 2000; Lindemann, 2001; Margolskee, 2002) (Figure 9).

2.6.1.2. Transduction des molécules amères

Les molécules amères sont détectées par une famille de récepteurs couplées aux protéines G. La transduction du signal des molécules amères passe par l'activation de la phospholipase C, provoquant une augmentation de l'Ins(1,4,5)P3. Cette voie permet aussi l'activation du phosphodiesterase (PDE) par le $G\alpha_{gustducin}$ (Margolskee, 2002). L'ouverture des organelles de stockage de calcium s'ensuit de manière synergique. L'augmentation du calcium cytosolique est suivie d'une inhibition de la conductance du K^+ , ce qui induit la dépolarisation de la membrane le long des axones (Lindemann, 2001) (Figure 9).

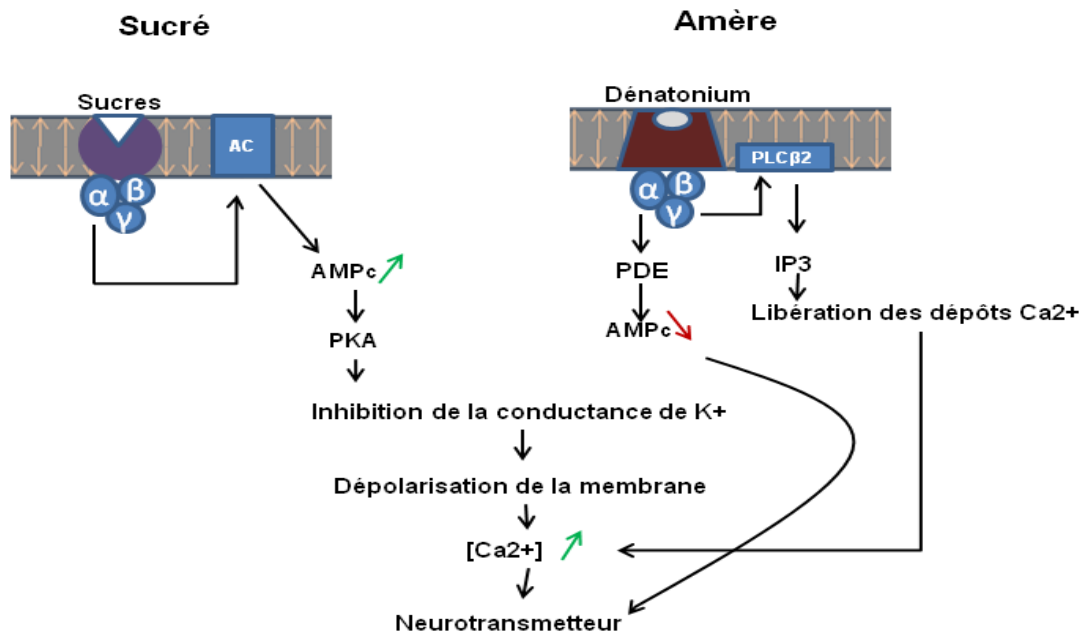


Figure 9. Mécanisme et cascade de transduction dans les cellules gustatives des vertébrés après activation des récepteurs par les molécules sucrées et amères.

2.6.2. Transduction du signal chimio-sensorielle chez les insectes (*drosophile*).

Les ORs et les GRs des insectes consistent en 7 domaines transmembranaires. Des auteurs ont rapportés que la topologie de ces récepteurs est inversée par rapport à leurs homologues chez les mammifères avec la partie C-terminal extracellulaire et la partie N-terminal cytoplasmique (Benton et al., 2006; Smart et al., 2008). *A priori* ce scénario interdit le couplage avec les protéines G du fait que les domaines d'ancrage sont inversés par rapport au plan de la membrane.

Les récepteurs olfactifs forment apparemment des hétéromères avec un récepteur particulier, Or83b, qui est co-exprimé virtuellement dans tous les *Olfactory Receptor Neurons* (ORNs) (Neuhaus et al., 2005; Benton et al., 2006). Des études récentes suggèrent paradoxalement que les ORs chez les insectes fonctionnent comme des récepteurs ionotropiques, chaque OR formant avec l'Or83b un canal ionique (Sato et al., 2008; Wicher et al., 2008). L'expression ectopique de l'Or83b et d'un Or particulier montre une réponse électrophysiologique rapide induite par des odeurs spécifiques. Ce signal rapide semble indépendant de la signalisation liée aux protéines G. Par contre, Wicher *et al.* (2008) ont pu observer un deuxième signal plus lent et plus large qui semble dépendant d'un mécanisme lié à l'activation des protéines G. Ceci suggère que les récepteurs olfactifs des insectes ont une fonctionnalité duale: comme récepteurs métabotropique couplé aux protéines G, et comme canaux ioniques (Figure 10). Toutes ces observations nous amènent à l'hypothèse d'un mécanisme à deux étages. Tout d'abord, la fixation de l'odeur sur le récepteur induit l'ouverture du canal ionique Or/Or83b ce qui se traduit par un signal électrique rapide, suivi d'un 2^{ème} signal plus lent et plus large lié à l'activation de la voie de l'AMP cyclique. Quant au niveau du système gustatif des insectes, un scénario parallèle semble se dessiner au travers de nombreuses études de biochimie et d'électrophysiologie réalisées par différents auteurs. Des études comportementales et d'électrophysiologie ont montré l'implication de Gs α (sous unité stimulatrice *alpha* de la protéine G) activant l'adenylate cyclase afin d'augmenter la production d'AMPc dans la réponse aux sucres chez les drosophiles (Ishimoto et al., 2005; Ueno et al., 2006). Bien que les mécanismes d'action soient controversés parmi les auteurs, les récepteurs gustatifs chez les insectes semblent obéir aux mêmes règles que leur homologues olfactifs (inversion de la topologie, incertitude au regard des mécanismes d'action: canal ionique et/ou couplage récepteur-cyclase).

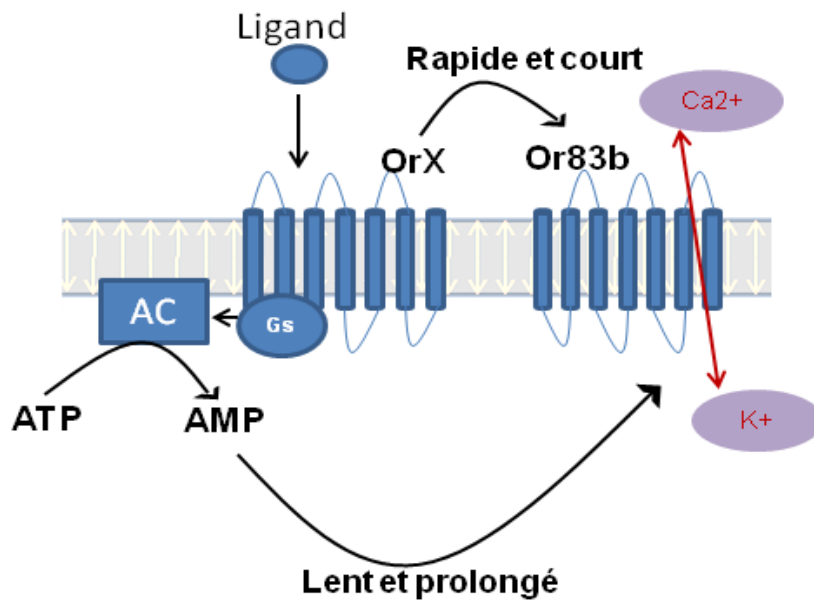


Figure 10. Schéma hypothétique d'un récepteur olfactif chez les insectes. Après stimulation d'un récepteur par une odeur, le complexe Or83b/Or est activé conduisant à une réponse ionotrope et métabotrope. L'activation rapide et courte aboutit à une conductance ionique. La voie métabotrope passe par l'activation des Gs qui, à son tour, stimule l'adénylate cyclase, le pique d'AMPc qui en résulte active l'Or83b dans une seconde vague différée plus lente et moins intense.

2.7. Expression atypique des récepteurs gustatifs

Le système gustatif chez la drosophile est un système très diversifié avec des récepteurs spécifiques pour les sucres, d'autres pour les molécules amères et d'autres enfin pour les phéromones. . Deux récepteurs gustatifs (Gr21a et Gr63a) sont exprimés dans les neurones olfactifs de l'antenne et sont décrits comme récepteur au CO₂ (Jones et al., 2007). Certains de ces récepteurs peuvent donc être associés à des fonctions non-gustatives du fait de leur localisation neuro-anatomique. Par exemple trois gènes de la famille Gr (*Gr28a*, *Gr28b.b* et *Gr28b.c*) sont exprimés au niveau d'une unique cellule localisée à la base du palpe maxillaire avec une/des fonction(s) inconnue(s) (Thorne and Amrein, 2008). *Gr28b.c* est exprimé aussi au niveau des neurones de l'organe de Johnston (JO) décrit comme l'« oreille » (organe auditif) de la drosophile. Son rôle semble être lié à la détection des mouvements vibratoires (Kamikouchi et al., 2006). Aussi l'organe chordotonal (organe sensoriel interne qui est impliqué dans l'équilibre) exprime des Grs. De plus *Gr28b.d* est exprimé dans trois neurones à la base de l'*arista* dont le

rôle probable est de type senseur thermique (Thorne and Amrein, 2008) Ce récepteur est exprimé aussi au niveau des neurones chordotonal multi dendritiques (*md*) présents dans l'abdomen et sensible à la douleur et/ou à divers stress chimiques. *Gr28a* est aussi exprimé dans les neurones md de l'abdomen. Il est à noter que ces récepteurs, bien qu'ils soient exprimés d'une façon atypique au niveau de plusieurs organes non gustatifs, sont aussi fortement présents dans les organes gustatifs. Ces données montrent que ces récepteurs peuvent jouer des rôles non gustatifs dont les fonctions pour réguler des mécanismes physiologiques et comportementaux sont largement inconnues.

3. Système olfactif chez la drosophile

3.1. Organes olfactifs

Le système olfactif chez la drosophile, contrairement au système gustatif, est spatialement restreint. Ce système est constitué de deux organes: l'antenne et le palpe maxillaire (Figure 11a). Ces deux organes olfactifs sont couverts de sensilles abritant les ORNs (Figure 11b).

3.1.1. Antenne

L'antenne est décorée de trois types des sensilles (basiconique, trichoïde et coeloconique, voir ci-dessous) et contient approximativement 2.400 ORNs. Les sensilles basiconiques sont en nombre moindre chez le mâle et les sensilles trichoides plus nombreuses chez la femelle.

3.1.2. Palpe maxillaire

Le palpe maxillaire a une structure plus simple que celle de l'antenne et contient un seul type de sensille (basiconique). Chaque palpe est couvert de 60 sensilles, sans apparent dimorphisme sexuel dans la structure ou la fonction.

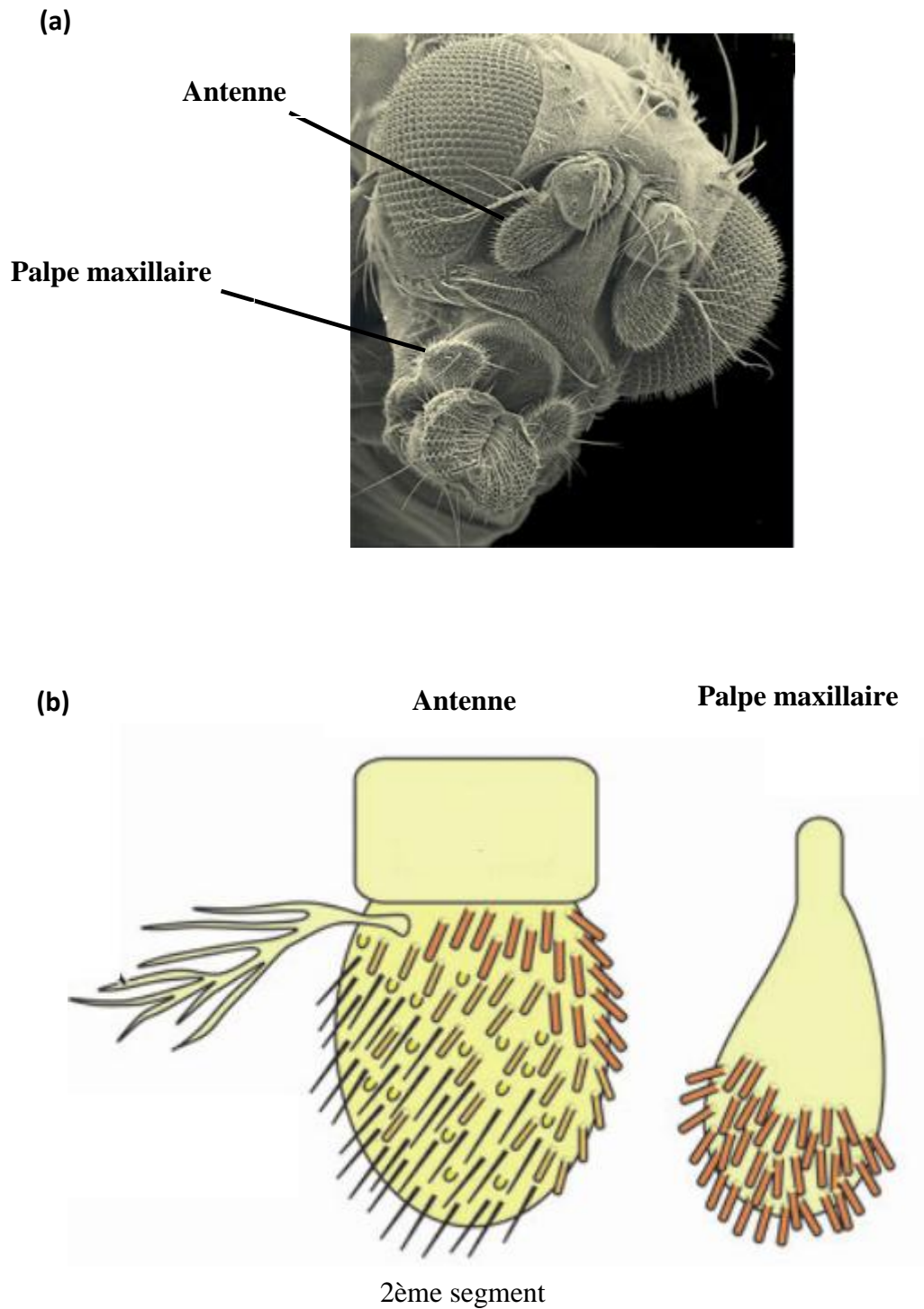


Figure 11. Représentation des organes olfactifs chez la drosophile. (a) Image microscopique de la tête de drosophile, indiquant les organes olfactifs: antenne et palpe maxillaire. (b) Schéma illustrant l'anatomie des sensilles olfactives (modifié de Vosshall and Stocker, 2007).

3.2. Sensilles Olfactives

On distingue trois types des sensilles olfactives qui diffèrent au niveau de la forme et de la fonction. Ces sensilles contiennent en général 1-4 neurones olfactifs accompagnés des cellules accessoires: une cellule trichogène, une cellule tormogène et une cellule thocogène (Figure 12). Ces types de sensilles sont décrits ci-dessous.

3.2.1. Sensilles Basiconiques (BS)

Ce sont des sensilles dont le poil creux contient plusieurs pores de 30 nm de diamètre. Il existe des sous-populations: les « petits », contenant 2 neurones, et les « grands », contenant 2-4 neurones. Les sensilles basiconiques sont impliquées dans la perception des alcools à chaîne courte et des acides gras (Figure 13).

3.2.2. Sensilles Trichoïdes

Elles correspondent à des sensilles dont le poil est multi poreux avec un diamètre de pore de 10nm. Chaque sensille contient de 1-3 neurones (Figure 13).

3.2.3. Sensilles Coeloconiques

Correspondant à des sensilles dont le poil est caractérisé par des rainures longitudinales au niveau de leur surface. Chaque sensille contient 3 neurones (Figure 13).

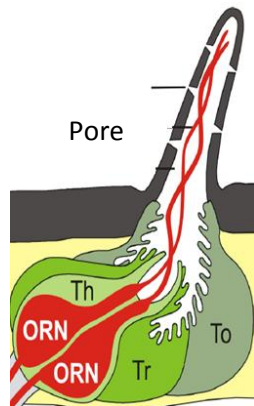


Figure 12. Sensille olfactive contenant deux ORNs et trois cellules accessoires: thocogène (TH), tormogène (TO) et trichogène (TR). Les molécules odorantes passent à travers les pores vers la lymphe de la sensille où elles se lient à des OBPs pour être ensuite transportées vers des récepteurs au niveau des dendrites des neurones olfactifs.

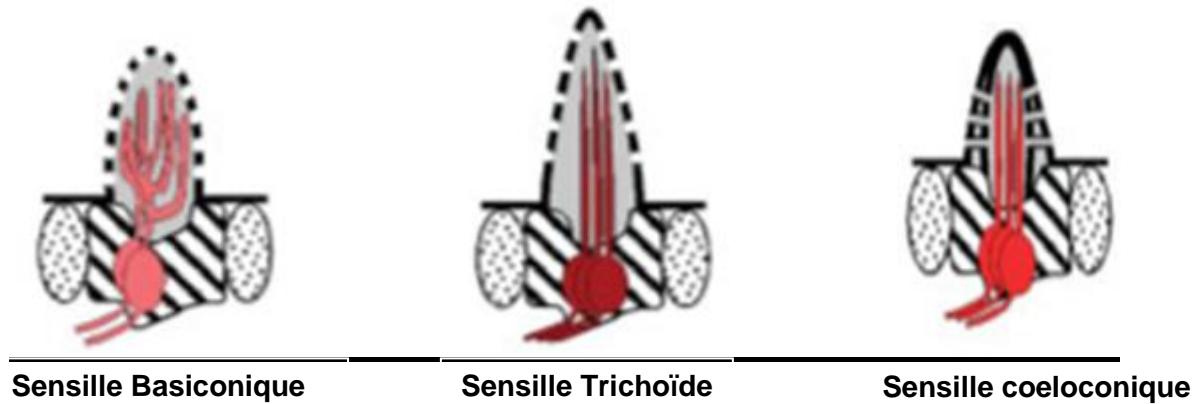


Figure13. Différentes morphologies des sensilles olfactives. *Sensille coeloconique, sensille basiconique et sensille trichoïde. Les ORNs sont en rouge* (modifié de Bruyne and Warr, 2006).

3.3. Récepteurs Olfactif

Les ORs ont été identifiés en 1999 à l'aide des approches bio-informatiques en utilisant un algorithme qui recherche des familles de protéines à sept domaines transmembranaires (Clyne et al., 1999; Gao and Chess, 1999; Vosshall et al., 1999). Chez la drosophile, cette famille est constituée de 60 gènes, avec une homologie de séquence d'acides aminés très faible, de l'ordre de 20%. Des études ont montré que chaque OR est exprimé spatialement dans une sous-population d'ORNs au niveau de l'antenne ou du palpe maxillaire (Clyne et al., 1999; Gao and Chess, 1999; Vosshall et al., 2000; Goldman et al., 2005). Un seul OR, Or83b, est co-exprimé virtuellement dans tous les ORNs de la drosophile (Vosshall et al., 1999) et fonctionne comme co-récepteur obligatoire associé avec un OR singulier, ce qui confère la spécificité du signal. Bien que la plupart des neurones olfactifs expriment un seul complexe Or83b/Or, il existe des neurones qui expriment deux ou trois ORs en plus de l'Or83b.

Les ORs exprimés dans des ORNs de type trichoïde ne sont pas activés par les odeurs de fruit en décomposition (niche écologique des drosophiles) à la différence des ORs exprimés dans les ORNs basiconiques de l'antenne et du palpe maxillaire (Goldman et al., 2005; Hallem and Carlson, 2006) (Figure 14).

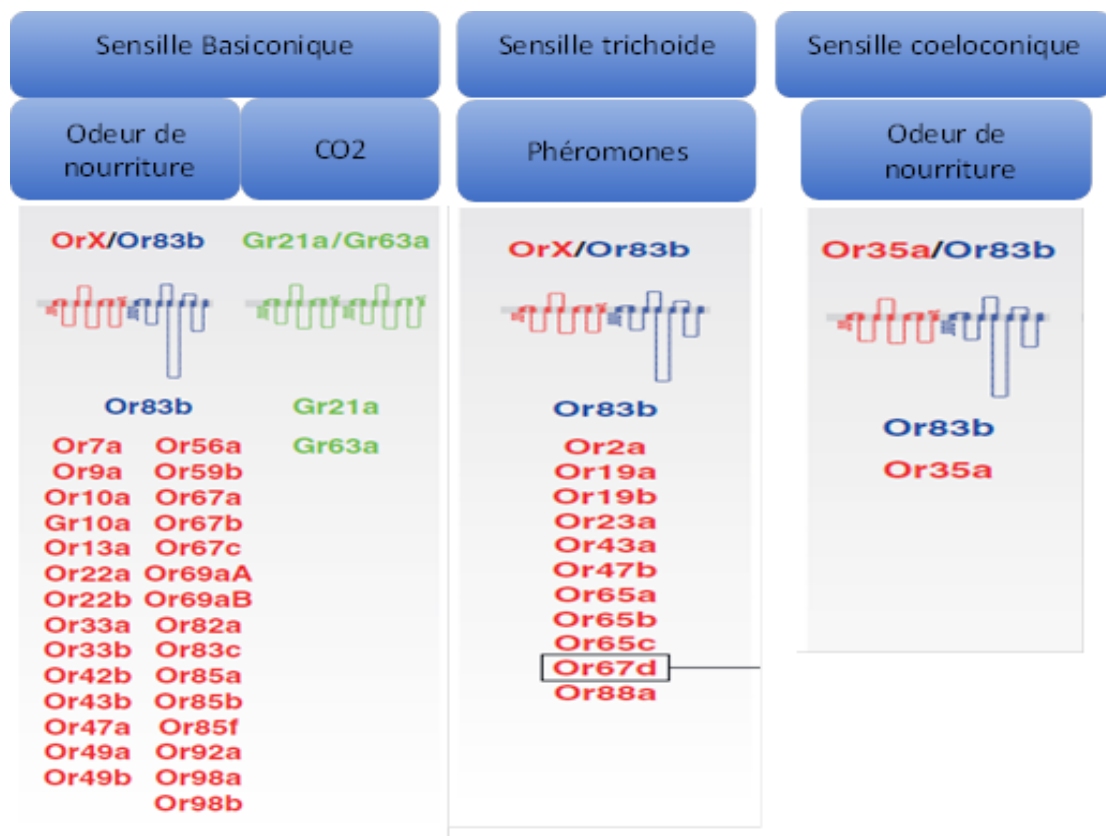


Figure 14. Liste complète des Ors et Grs exprimés dans les ORNs en relation avec leur sensille appropriée. Or83b est un co-récepteur obligatoire pour tous les neurones olfactifs à l'exception des neurones sensibles au CO₂. (modifié de Vosshall and Stocker, 2007).

3.4. Odorant Binding Proteines

Les OBPs sont des petites protéines globulaires de 135-220 acides aminés qui se lient aux molécules odorantes et aux phéromones de nature hydrophobe afin de les solubiliser et les transporter. Ces protéines sont synthétisées dans les cellules accessoires qui entourent les neurones et sont présentes dans l'espace extracellulaire. La structure de ces molécules est caractérisée par un domaine comprenant six hélices-alpha reliées par trois ponts disulfure (Scaloni et al., 1999). Le rôle hypothétique de ces protéines est de fixer les molécules odorantes afin de les transporter jusqu'aux récepteurs localisés dans les dendrites des neurones sensoriels. De plus, des études suggèrent la possibilité d'un rôle pour ces protéines dans le codage des

molécules olfactives et phéroménales (Laughlin et al., 2008). Enfin des analyses de l'expression des gènes chez les insectes ont montré que les OBPs ne sont pas restreints aux tissus olfactifs et gustatifs, sont des protéines abondantes, déposées sur l'ensemble de la cuticule et devraient de toute évidence participer à d'autres fonctions inconnues.

3.5. Projections axonales du système olfactif

L'activation des ORNs au niveau des organes olfactifs de la drosophile (troisième segment antennaire et palpes maxillaires) génère un signal qui va être transmis dans un centre nerveux appelé Lobe Antennaire (AL) composé de glomérules. Les ORNs exprimant les mêmes ORs se projettent vers des glomérules identiques (Fishilevich et al., 2005). Des études ont montré l'existence d'une carte de glomérules qui dépend de la nature chimique des odeurs, tels les composés aliphatiques et aromatiques (Couto et al., 2005). Les différents types de neurones des sensilles se projettent au niveau du lobe antennaire de la manière suivante: les neurones des sensilles basiconiques de l'antenne se connectent au niveau de la partie médiane du lobe antennaire, les neurones trichoïdes au niveau de la partie latérale, les neurones basiconiques de la palpe maxillaire au niveau de la partie antérieure et les neurones coeloconique au niveau de la partie ventrale (Stocker, 1994; Couto et al., 2005; Wilson and Laurent, 2005). Les informations sont transférées au MB qui contrôle plusieurs fonctions dont l'apprentissage olfactif et l'activité locomotrice (Figure 15). Tous les ORNs chez la larve de drosophile ciblent une structure appelée Lobe Antennaire Larvaire (LAL). Chaque ORN exprimant un OR se projette dans un seul glomérule spécifique au niveau du LAL. Comme pour la drosophile adulte, les projections neuronales chez la larve relient les glomérules aux *calyx* des corps pédonculés et aux cornes latérales (Python and Stocker, 2002; Marin et al., 2005; Gerber and Stocker, 2006).

Il a été montré que le nombre d'ORNs chez la larve est limité à 21. Ces ORNs se projettent donc dans 21 glomérules (Fishilevich and Vosshall, 2005) et chacun de ces glomérules se connecte aux *calyx* (Ramaekers et al., 2005) (Figure 15). Il est donc possible de modéliser une carte précise du cerveau qui décrit le cheminement du signal lorsqu'une molécule odorante active un OR (Nakagawa and Vosshall, 2009).

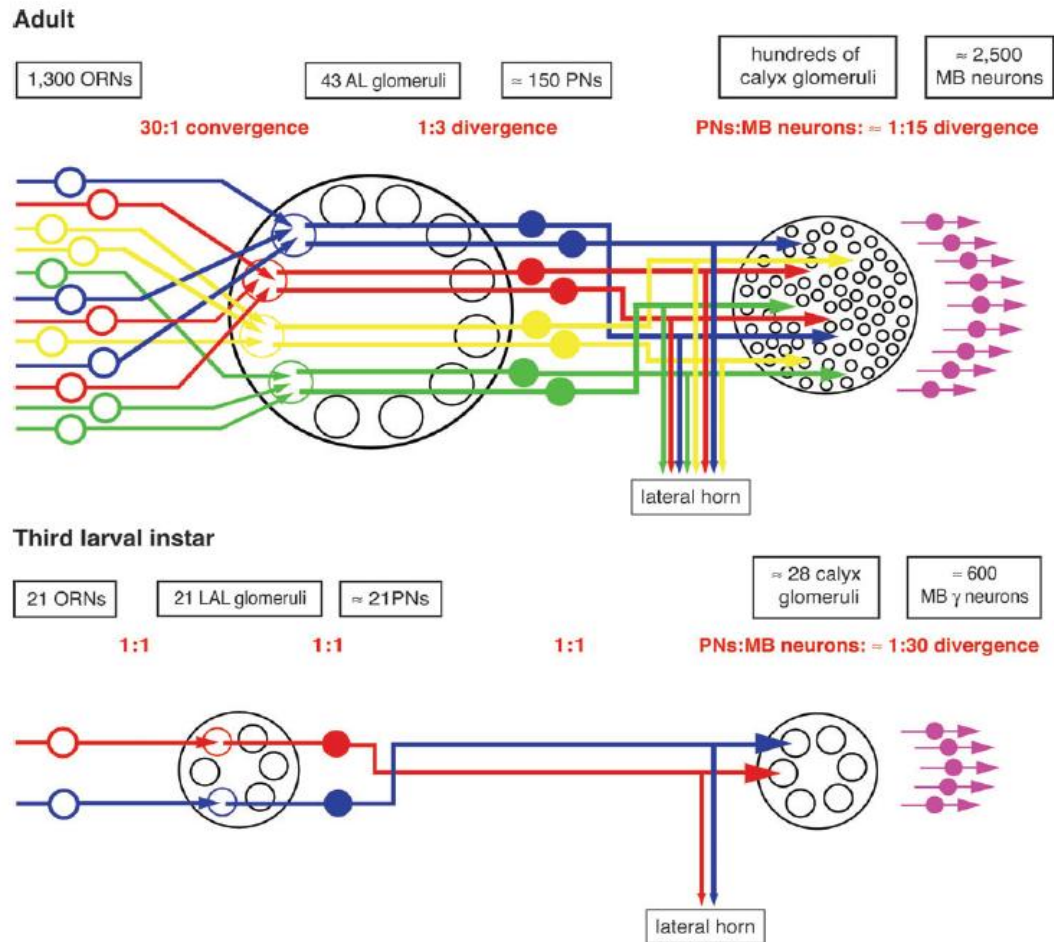


Figure 15. Schéma des projections neuronales du système olfactif chez la larve et l'adulte de *drosophile*. Les deux schémas de projection se ressemblent. Chez l'adulte, on trouve plusieurs copies des ORNs (cercle vide) qui innervent un seul glomérule. Par contre, chez la larve, on n'en trouve qu'une seule copie. La voie olfactive chez l'adulte est caractérisée par des convergences et des divergences tandis que chez la larve cette voie est organisée sans redondance. (Gerber and Stocker, 2006).

4. Aile de drosophile

L'aile de drosophile se développe à partir du disque imaginal chez la larve (Blair, 2003; Blair, 2007). Durant les trois stades larvaires, les cellules se divisent pour former un disque de 50.000 cellules. Ce disque est constitué de deux régions, une ventrale et l'autre dorsale. La marge antérieure de l'aile donne lieu à des différenciations cellulaires qui vont donner naissance aux organes sensoriels: les mécano-récepteurs et les chimio-récepteurs qui formeront un nerf unique.

L'aile de drosophile est structurée par des veines. Il existe cinq veines longitudinales (L1-5), deux petites veines (L0 et L6) et trois veines transversales (ACV, PCV et HCV) (Figure 16). Ces veines sont principalement des structures de renforcement formées de chitine (Blair, 2007). La marge antérieure de l'aile de drosophile est équipée de sensilles. Ces dernières sont organisées en trois rangées au niveau proximal et en deux rangées au niveau distal (Figure 17). La limite entre les double et triple rangées se situe à l'intersection de la veine L2 au niveau de la marge antérieure de l'aile. Au niveau proximal (trois rangées), on trouve dans la partie dorsale des sensilles fines, allongées et recourbées (les chimio-sensorielles) et des sensilles épaisses et courtes (les mécano-sensorielles). La partie ventrale contient ces deux types de sensilles alternées sur la même ligne (les sensilles recourbées sont espacées l'une de l'autre par quatre sensilles épaisses). Les deux rangées de la partie distale (ventrale et dorsale), sont identiques et contiennent des sensilles recourbées et épaisses alternées (Hartenstein and Posakony, 1989; Stocker, 1994) (Figure 17).

Les sensilles chimio-sensorielles sont pluri-innervées avec quatre neurones gustatifs. Les sensilles mécano-sensorielles sont mono-innervées avec un seul neurone. Les axones des deux types des neurones dans les trois rangées constituent des faisceaux entrelacés formant un seul nerf le long de la marge antérieure de l'aile. Ce nerf se dirige vers les ganglions thoraciques (Hartenstein and Posakony, 1989; Stocker, 1994). Ces deux types des sensilles sensorielles envoient leurs informations spécifiques et non reliées en utilisant le même nerf, ce qui forme un système de coïncidence et de synchronisation dans lequel les deux types de signaux peuvent s'influencer.

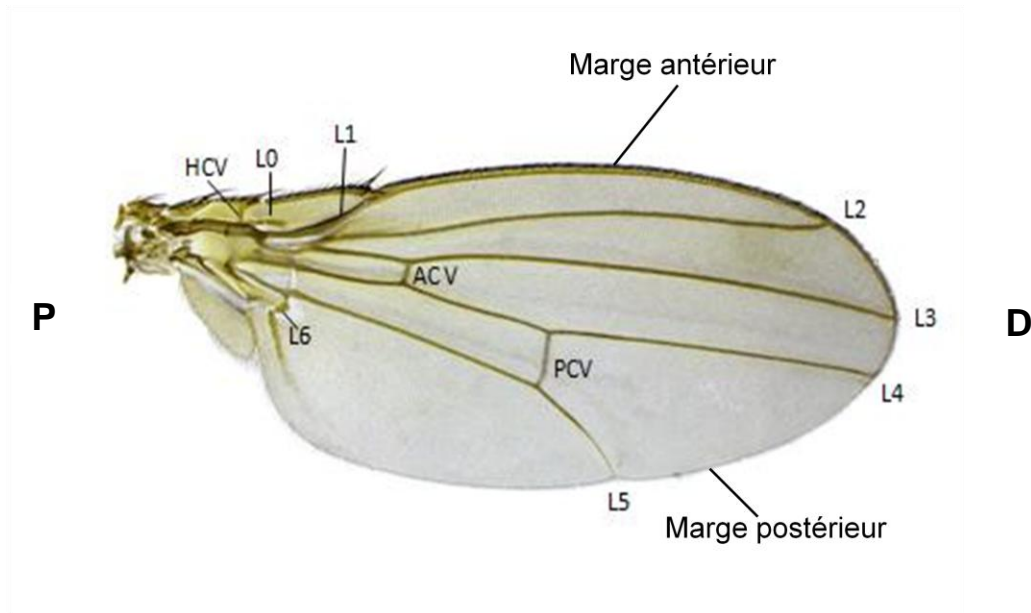


Figure 16. Illustration des veines dans l'aile de drosophile. L0-L6 représentent la nomenclature des veines et leurs positions. ACV, PCV et HCV représentent les trois veines transversales. Le schéma indique l'emplacement de la marge antérieure (lieu d'innervation intense) et postérieure de l'aile

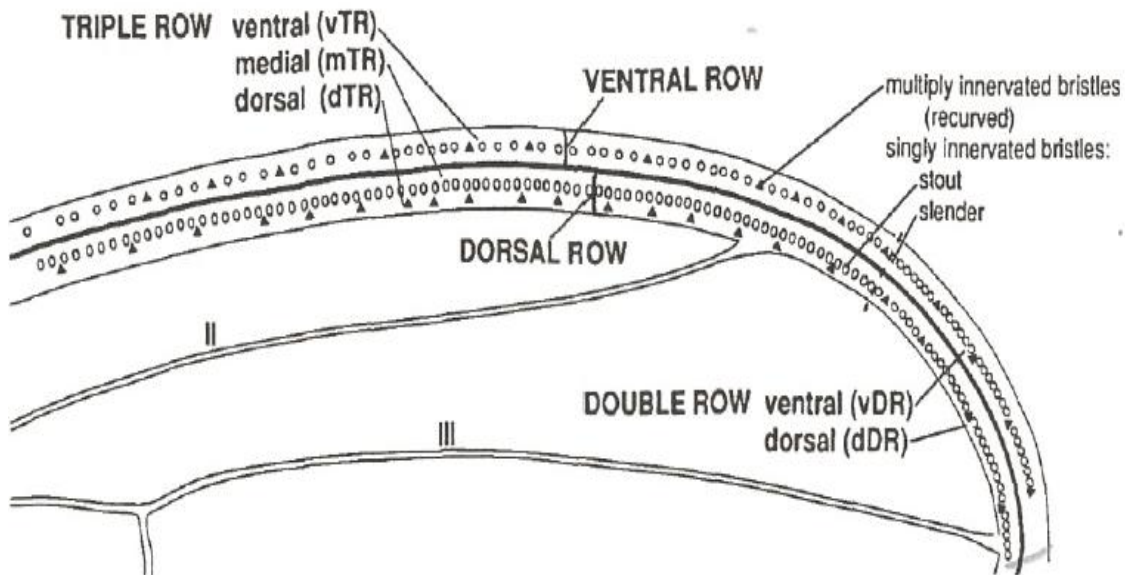


Figure 17. Distribution et organisation des sensilles au niveau de la marge antérieure de l'aile de la drosophile (modifié de Hartenstein and Posakony, 1989).

5. Leading edge vortex « Vortex en marge de l'aile »

La possibilité de voler et conquérir les airs caractérise l'évolution des insectes. Au cours des 350 derniers millions d'années, les insectes ont développé des aptitudes au vol remarquables et techniquement sophistiquées. Les connaissances les plus récentes en aérodynamique ne sont pas en mesure d'expliquer toutes les performances des insectes. Cependant, les auteurs (Dickinson et al., 1999; Sane, 2003) sont unanimes pour dire que le vol des insectes crée un vortex d'air ou turbulence qui s'évacue le long de la marge antérieure de l'aile en spirale, appelé *Leading Edge Vortex* (LEV). Selon le mécanisme proposé le battement des ailes se décompose en deux demi-battements basiques. Le battement vers le bas commence du haut vers l'arrière puis plonge vers le bas et finalement remonte vers l'avant (Sane, 2003) (Figure 18). La fréquence des battements des ailes des insectes peut excéder 1.000 Hz (200-300 Hz chez les drosophiles). Le mouvement de battement des ailes durant le vol crée donc un flux circulaire (vortex) autour et au dessus du bord postérieur de l'aile (Figure 19). Ce vortex, dû à une dépression devant le bord postérieur de l'aile, et une surpression derrière l'aile, pourrait être en mesure de capturer des molécules durant le vol pour les adresser aux sensilles du bord antérieur de l'aile.

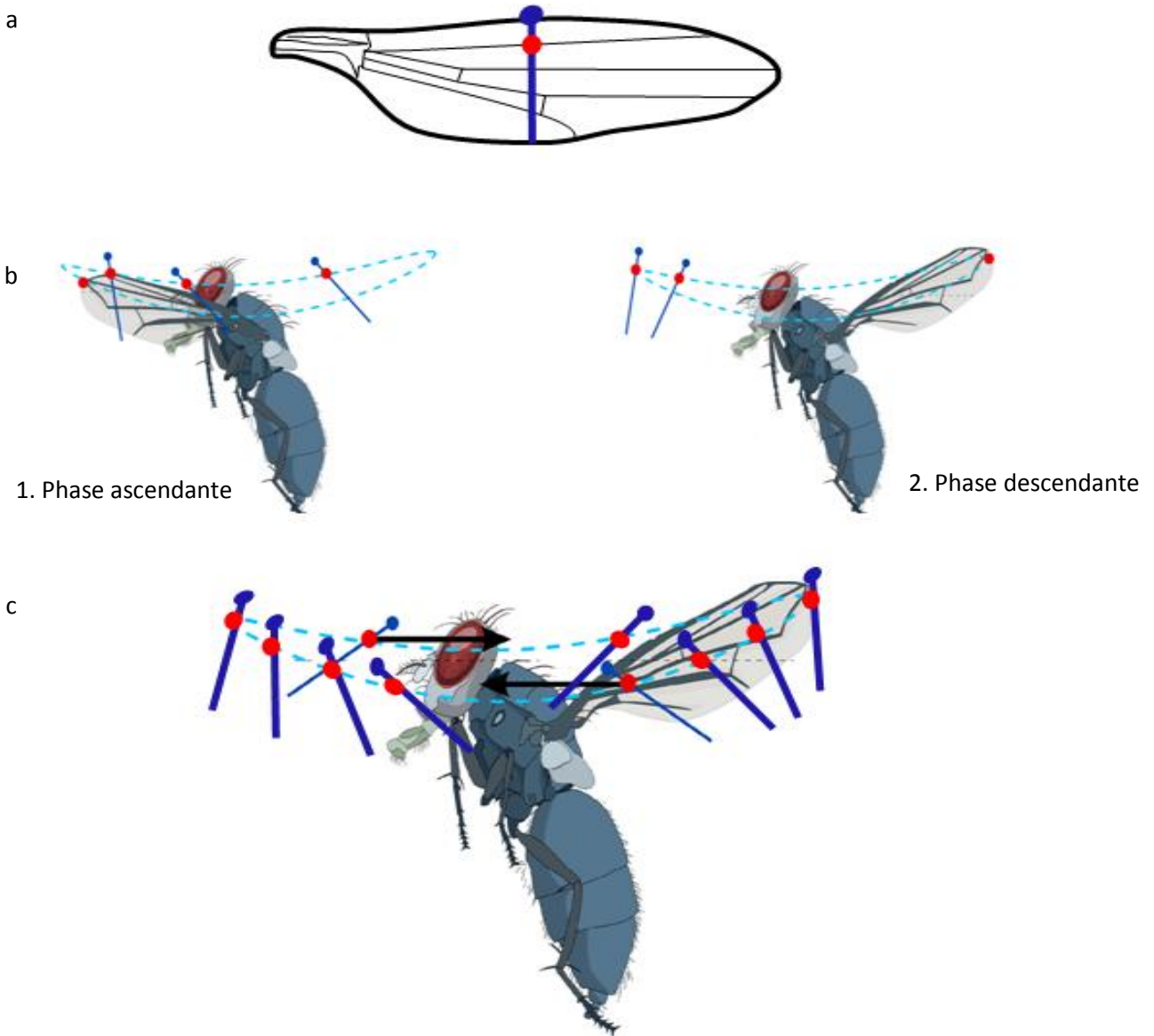


Figure 18. Représentation de la position de l'aile de drosophile durant le vol. (a) Le trait bleu est en position transversale et perpendiculaire par rapport à l'axe longitudinal de l'aile. (b) 1 et 2 schématisent respectivement la phase ascendante et descendante de l'aile au cours du vol. La ligne bleu ciel pointillée indique le trajet parcouru par l'aile durant son cycle. Le trait bleu représente les positions de l'aile dans la déconstruction du vol. (c) Schéma général représentant les positions de l'aile et les directions du mouvement (flèches en noir) durant le vol.

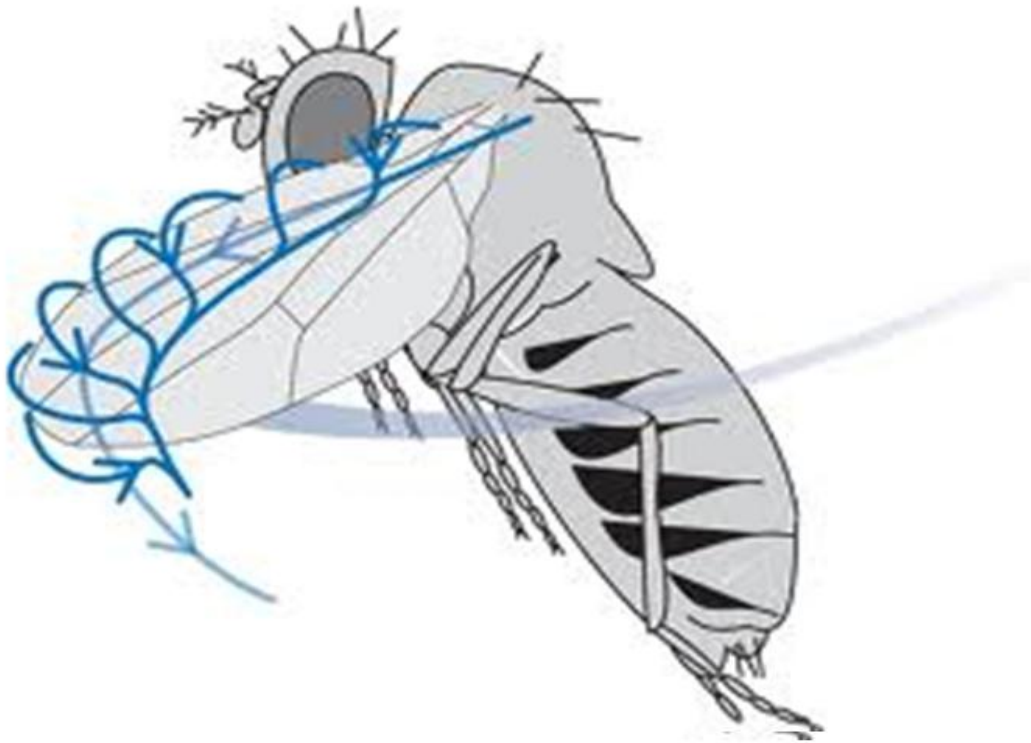


Figure 19.*Drosophile durant le vol., Les lignes bleues représentent la turbulence « Leading edge vortex » créée durant le vol.*

OBJECTIFS

[OBJECTIFS]

Le système gustatif des insectes est distribué sur des zones spécialisées du corps. Il est présent sur le proboscis, les pattes, les ailes et au niveau de l'ovipositeur des femelles. Si la présence des récepteurs gustatifs à l'extrémité de l'abdomen de la femelle est en faveur d'un arc réflexe simple entre sensation gustative et ponte des oeufs sans « passer » par le proboscis, l'existence de ces mêmes récepteurs gustatifs sur l'aile est étrange et a longtemps résisté à l'émergence d'hypothèses convaincantes. De plus, l'expression de certains récepteurs gustatifs (Grs) n'apparaît pas strictement en relation avec la gustation (Montell, 2009). Certains Grs sont exprimés dans des neurones olfactifs (Dunipace et al., 2001), dans les neurones de l'organe de Johnston (constituant le système auditif chez les insectes) ou encore dans l'organe chordotonal (organe sensoriel interne qui est impliqué dans l'équilibre). Plus étonnant encore, certains Grs semblent impliqués dans les mécanismes de détection du CO₂ (Fischler et al., 2007) et des auteurs ont émis l'hypothèse que des Grs sont aussi impliqués dans la sensation thermique (Montell, 2009). Tous ces résultats suggèrent des rôles non gustatifs pour les Grs avec de multiple fonctions sensorielles entrelacées et non élucidées.

La bordure antérieure des ailes des insectes est tapissée de cellules nerveuses qui ont été décrites comme relevant des organes du goût sans pour autant que la preuve de la fonctionnalité de ces structures ait été faite (Stocker, 1994). De plus, ces cellules sensorielles expriment des récepteurs gustatifs au même titre que ceux existants dans le proboscis alors que des récepteurs olfactifs pour le captage des odeurs en vol eut été en toute logique plus évident et attendu. Ces cellules sensorielles organisées en sensilles sont par ailleurs alternées avec des sensilles spécialisées dans la perception mécanique. Ces mécano-récepteurs ont été très peu étudiés et sont méconnus quant à leur mode d'action. Plus étonnant encore, les axones de ces deux entités sensorielles séparées forment un nerf unique ce qui renforce l'hypothèse d'un système de coïncidence et de simultanéité, et donc d'un fonctionnement dual et intégré. L'idée est que la bordure antérieure de l'aile fortement innervée est impliquée dans le contrôle du vol, l'équilibre de l'insecte, le changement de direction en vol en même temps que dans la capture des informations chimiques sur l'environnement. Le rôle et la façon dont fonctionne le dispositif neuronal de l'aile est encore très mystérieux. Des experts de l'aérodynamique ont montré que les battements des ailes des insectes varient entre 50 et 1.000 Hertz, ce qui crée un vortex autour de la marge antérieure de l'aile appelée *Leading edge vortex* (LEV) (Figure 19) (Dickinson et al., 1999; Dickinson, 2006). La juxtaposition d'une zone de surpression et dépression créée par les

[OBJECTIFS]

battements d'ailes provoquent une turbulence qui glisse en spirale le long de la bordure antérieure de l'aile. Nous sommes partis de l'observation que la turbulence en spirale générée par le vol coïncide parfaitement avec l'emplacement du nerf costal et sa double modalité sensorielle (mécanique et chimique). En se basant sur ces données, le travail présenté vise à corroborer l'hypothèse que les battements des ailes, dans l'exercice du vol, nébulisent des microgouttelettes d'eau enrichies en molécules sapides et/ou odorantes qui seront aspirées par le vortex et donc amenées/présentées aux cellules sensorielles de la bordure antérieure de l'aile. Ceci nous semble pertinent pour les insectes pollinisateurs qui, lors de leur vol stationnaire sur les fleurs pourraient goûter la fleur et son nectar sans l'obligation d'atterrir. Cette modalité sensorielle rendrait le processus d'exploration plus efficace et permettrait à l'insecte d'éviter l'intoxication digestive avec des substances nocives si tant est que le proboscis fût un organe du goût unique comme chez les mammifères. Notre travail vise donc à interroger l'histoire évolutive chez les insectes qui a conservé une modalité gustative en apparence anachronique mais qui pourrait cacher une stratégie hautement sophistiquée et efficace pour sonder l'environnement et guider les trajectoires et l'exploration.

Par conséquent, dans ce travail nous abordons les questions suivantes:

- Pourquoi des récepteurs gustatifs sur les ailes à la place des récepteurs olfactifs attendus?
- Quels sont les récepteurs gustatifs dans l'aile des insectes?
- Comment le dispositif neuronal fonctionne-t-il? Quelles sont les molécules capables d'activer les récepteurs associés à ces structures?
- Quels sont les mécanismes de guidage dépendants de ce système en relation avec les comportements de l'insecte? Quel est le rôle de ce système neuronal dans l'apprentissage Bayésien?
- Quelle relation existe-il entre les mécano- récepteurs et les chimio-récepteurs pour réaliser ce système sensoriel de coïncidence et de simultanéité?

Pour répondre à toutes ces questions, j'ai utilisé une méthodologie qui exploite des outils de la génétique très puissants et performants dans le modèle drosophile ainsi que des études de biochimie et de biologie cellulaire. Ce travail a été rendu possible grâce à un transgène sous promoteur fort qui exprime un dérivé de la molécule Green Fluorescent Protein (GFP) et dont la

[OBJECTIFS]

fluorescence est fortement induite suite à la formation de complexe avec le calcium. Nous avons montré pour la première fois dans ce travail que les récepteurs gustatifs de l'aile sont fonctionnels et répondent aux sucres et aux molécules amères par une élévation drastique du calcium.

MATERIELS ET METHODE

1. Élevage

Les lignées sont maintenues au laboratoire soit à 18°C soit à 25°C. Les drosophiles sont élevées dans des tubes sur un milieu nutritif préparé de la façon suivante : 30 g d'agar dans 3 litres d'eau portés à ébullition. Après quelques minutes d'ébullition on rajoute 75 g de sucre, puis 240 g farine de maïs et 60 g de levure. Au mélange homogène on ajoute 180 ml de Moldex (10 % méthyl 4-hydroxybenzoate; 90 % (éthanol 95%). Le milieu est coulé dans des petits tubes en polystyrène, et/ou dans des flacons. Les tubes et les flacons sèchent une nuit à température ambiante puis sont stockés à 4°C.

2. Prélèvement des individus et croisements

Les mâles et femelles vierges sont triés et séparés grâce aux critères anatomiques classiques (abdomen noir et présence de peignes sexuels chez les mâles). Sachant qu'à la température de 25°C les premières mouches sont matures sexuellement au bout de 8 à 10 heures après leur émergence, les femelles sont isolées avant ce délai.

Pour les croisements les femelles vierges (3-7 individus d'une lignée), sont placées dans un nouveau tube d'élevage avec 2-4 mâles d'une autre lignée.

3. Les différentes lignées de drosophiles utilisées

Plusieurs lignées de drosophiles ont été utilisées lors de nos expériences:

- Canton-S (CS) : lignée sauvage d'origine nord-américaine, utilisée comme souche témoin
- *Pox neuro* (V47609) : mouches dépourvues des sensilles chimio-sensorielles. Les mouches homozygotes montrent des déficiences dans les sensilles gustatives. Toutes les sensilles gustatives de la marge antérieure de l'aile sont transformées en sensilles mecano-sensorielles.
- *Wing-Gal4* (6791): exprime GAL4 tout au long du disque imaginal de l'aile chez la larve. Nous avons montré au laboratoire que l'expression GAL4 est présente au niveau de la marge antérieure de l'aile chez l'adulte.
- *Tub-GAL4* : Permet l'expression de GAL4 dans toutes les cellules exprimant la protéine du cytosquelette: tubuline.
- *G-CaMP* : exhibe la fluorescence verte de la GFP à la suite d'un « pique » de calcium cytosolique.
- *UAS-GFP* (1521) : cette souche exprime le GFP sous le contrôle de GAL4.

4. Système UAS-GAL4

Le système UAS-GAL4 est une méthode génétique pour obtenir l'expression ectopique d'un gène d'intérêt (Brand and Perrimon, 1993). Le système est composé de deux transgènes: l'activateur de transcription de levure GAL4 et les *Upstream Activator Sequence* (UAS) suivis d'une information codante d'intérêt. Ce système binaire utilise les descendants du croisement des deux lignées qui porteront par conséquent une copie de chaque transgène. Le GAL4 exprimé selon son site d'insertion ou son promoteur se fixe sur les motifs UAS entraînant l'activation de la transcription en amont (Figure 20).

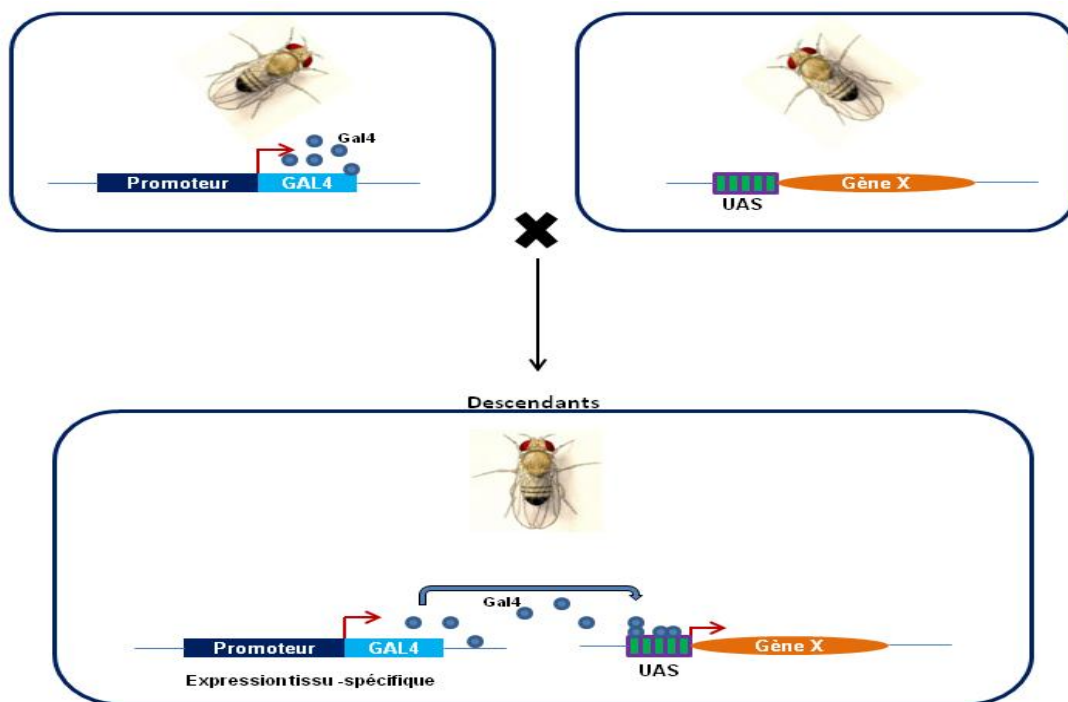


Figure 20. Représentation schématique du système UAS-GAL4. L'activateur GAL4 se fixe sur la séquence UAS en amont du gène d'intérêt.

5. Senseur de calcium

Le calcium est un second messenger. Plusieurs types de sondes basées sur la GFP ont été testées pour suivre la cinétique du calcium dans les cellules (Baird et al., 1999; Nakai et al., 2001). Récemment Nakai *et al.* ont conçus une nouvelle sonde (G-CaMP) que nous avons utilisé et qui est construite de la manière suivante : le EGFP (cpEGFP) circulairement permuté est connecté au M13 (voir ci-dessous) par son extrémité N-terminal et à la calmoduline par son extrémité C-terminal (Figure 21) et (Rhoads and Friedberg, 1997). Brièvement, la molécule de GFP est scindée en deux et les deux extrémités médianes sont connectées soit au M13 soit à la calmoduline, les extrémités N et C terminal natives étant jointes dans la nouvelle construction. Cette construction hybride a pour conséquence que peu de fluorescence est émise en bruit de fond. Par contre, une forte fluorescence est exhibée par le pontage M13 et la Calmoduline induite par le calcium.

M13 est un peptide synthétique. Sa séquence correspond au domaine de la fixation/accrochage de la chaîne légère de myosine kinase (skeletal muscle myosin light chain kinase, MLCK) à la calmoduline.

La calmoduline est une protéine monomérique, de 148 acides aminés (figure 21), ubiquitaire et capable de s'associer aux ions calcium présents dans le milieu cellulaire. Cette association induit un changement de conformation de la protéine et forme un complexe calcium-calmoduline (Ca^{2+} -CaM) qui permet la régulation de plusieurs mécanismes physiologiques et cellulaires, tout particulièrement en interagissant avec des enzymes cibles comme la myosin light chain Kinase (MLCK) ou le calcium calmodulin kinase (Cam kinase).

Le calcium cytoplasmique se fixe sur la calmoduline, soit après sa libération des organelles intracellulaires, soit par entrée des espaces extracellulaire via les canaux ioniques, ce qui aboutit à un changement de conformation de la protéine G-CaMP et fixation du peptide M13. La liaison entre CaM et M13 cause un changement de conformation au niveau de cpEGFP résultant d'une forte augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure 22).

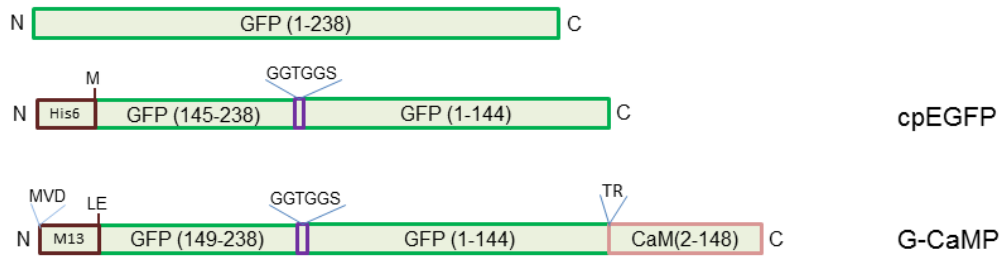


Figure 21. Représentation de la séquence de GFP, cpEGFP et G-CaMP. Haut : séquence de la GFP. Milieu : construction inversée par le milieu correspondant à cpEGFP avec une poly-histidine attachée au niveau du N-terminal. Bas : construction de G-CaMP avec M13 attaché au niveau du N-terminal et CaM au niveau du C-terminal.

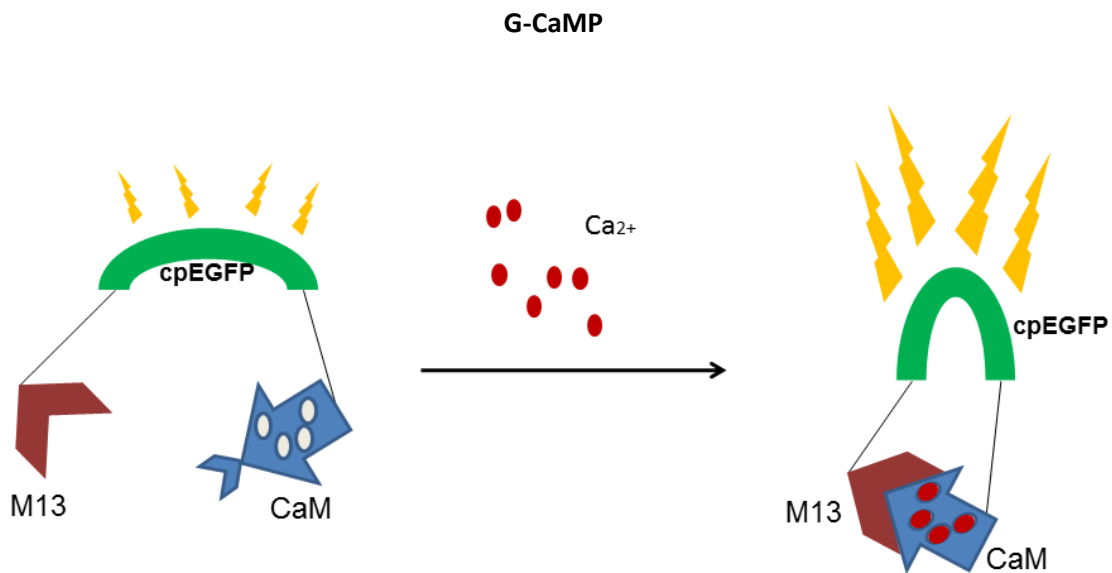


Figure 22. Représentation schématique du fonctionnement de la G-CaMP.

Nous avons exclu une autre technique très astucieuse basée sur l'aequorin modifiée (couplé à une molécule de GFP). Après fixation du calcium la partie prosthétique de l'aequorin «coelenterazine» se convertit en sa forme excitée «coelenteramide» associée à une molécule de CO₂. Ensuite, le «coelenteramide» transfère son énergie vers la molécule de GFP ce qui résulte de l'émission de fluorescence. La difficulté d'introduire le «coelenterazine» au travers des poils de l'aile nous a amenés à l'abandon de cette technique (Martin et al., 2007).

6. Test de comportement (trajectométrie).

a. Souches utilisées

Deux souches, la CS (souche sauvage) et *Poxn* (souche mutante par remplacement des chimio-récepteurs par des mécano-récepteurs dans l'aile avec le système olfactif intact).

b. Dispositif

Le système est décrit dans la partie (materials and methods « Behavioral analysis »). La prise de données pour des patrons d'orientation est réalisée via un système de trajectométrie. Dans ce dispositif, une caméra liée à un ordinateur est placée au-dessus de l'arène expérimentale et filme la drosophile en envoyant les informations à l'ordinateur. Un logiciel appelé « *Ethovision XT, Noldus Information Technology* » analyse les images et permet de tester plusieurs paramètres (vitesse linéaire, vitesse angulaire, temps passé dans une zone, distance parcourue, distance d'un point d'intérêt...) (Figure 23).

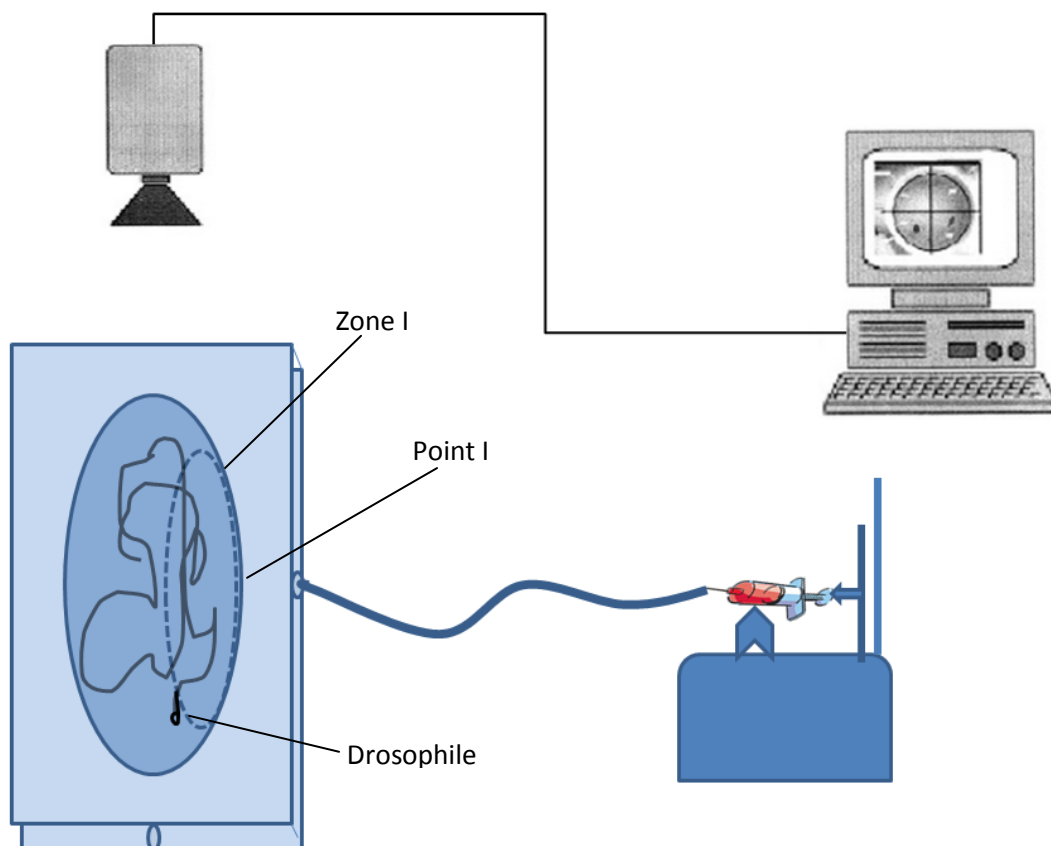


Figure 23. Représentation graphique du dispositif de la trajectométrie. Une seringue de 40ml déposée sur un « pousse seringue » est remplie avec 20ml de jus de raisin. Un tuyau relie la seringue l'arène expérimentale (décrit dans la partie « Materials and Methods »). Le pousse seringue est calibré à un débit de 2ml/min. La zone I est la zone d'entrée d'odeur en pointillé. La ligne noire dans l'arène représente le trajet suivi par la drosophile.

7. Test de choix

Les drosophiles sont pré exposées à 3 types de mélanges d'odeurs complexes (odeur jus de raisin frais, odeur de vieux jus de raisin fermentés et contrôle eau sucré) pendant 3 heures. Les mouches sont ensuite transférées dans une cage contenant chacune un tube avec du jus de raisin frais. Chaque tube est percé de trous de diamètre suffisant pour laisser rentrer les drosophiles. Ces drosophiles capturées dans les tubes est compté au bout de 24 heures.

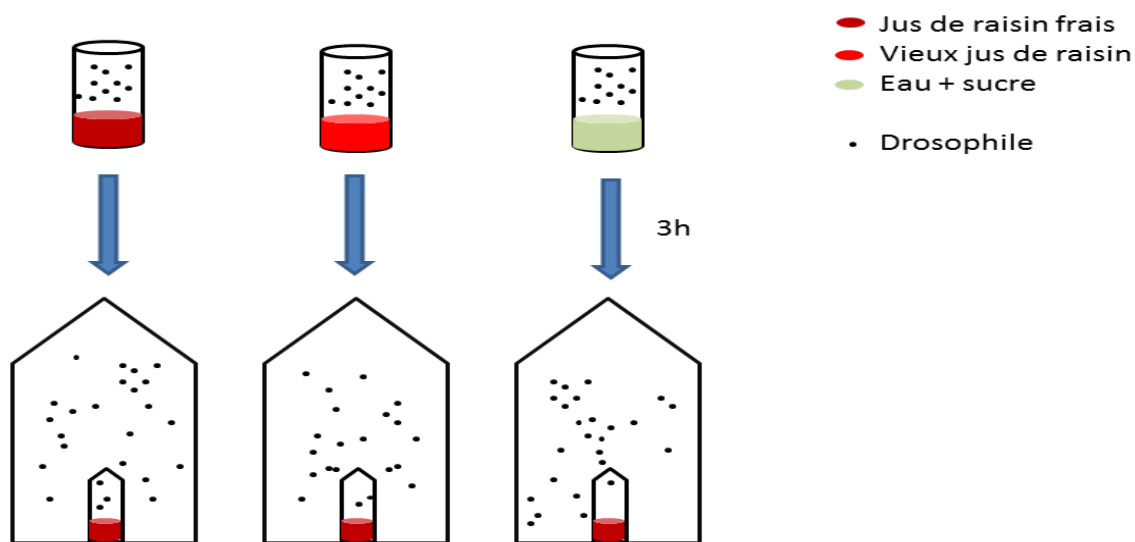


Figure 24. Représentation schématique du test de choix.

8. Liste des sucres et précurseurs glycosidiques utilisés

Sucres

Nom usuel	Formule chimique	Structure chimique	Masse molaire en g* mol^{-1}
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		180.16
Fructose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		180.16
Tréhalose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		342.296
Saccharose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		342.296
maltose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		342.296

Tableau 1. Tableau récapitulatif des sucres utilisés.

Précurseurs glycosidiques

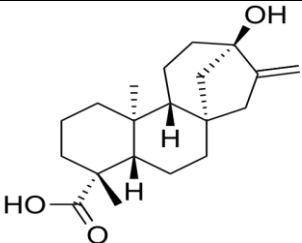
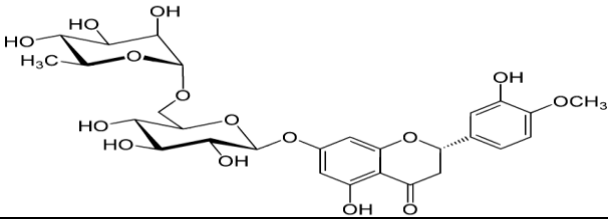
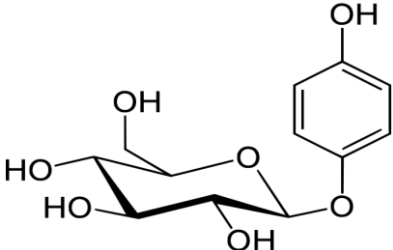
Nom usuel	Formule chimique	Structure chimique	Masse molaire en g* mol^{-1}
Stéviol	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$		318.45
Hespéridine	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$		610.545
Arbutine	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$		272.25

Tableau 2. Tableau récapitulatif des précurseurs glycosidiques utilisés.

9. Amorces utilisées pour l'RT-PCR

Récepteur au CO₂ (Gr21a et Gr63a)

dmGr21a

CCCAGGTGGCTATCTTCAAGAACA Fow $T_m = 58.5^\circ\text{C}$

CATTATCTGCAACGAGGCGCACTA Rev $T_m = 59.7^\circ\text{C}$

Intron 1: 75 pb

Intron 2: 56 pb

Intron 3: 53 pb

cDNA: 571pb

Genomic DNA: 755pb

dmGr63a

GATTGGATGCGGATTACGAAGCTC Fow $T_m = 58.4^\circ\text{C}$

ATTGCGACAGAAGGCGGTGTACAT Rev $T_m = 61^\circ\text{C}$

Intron 1: 60 pb

Intron 2: 75 pb

cDNA: 574 pb

Genomic DNA: 709 pb

Récepteurs aux sucres (Gr5a, 64a, 64f, 61a)

dmGR64a (sucrose, maltose, glucose)

TGGCTTGTCTTAGGCGAACAT Fow $T_m = 58.6^\circ\text{C}$

TCTACCTCATTGGACGAACGGCCTT Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

Intron 1: 56 pb

Intron 2: 62 pb

Intron 3: 51 pb

Intron 4: 55 pb

Intron 5: 50 pb

Intron 6: 70 pb

cDNA: 531 pb

Genomic DNA: 687 pb

dmGr64f (tous les sucres à l'exception de fructose)

GTAACCCGGACATCACTGTTCAGA Fow $T_m = 58.5^\circ\text{C}$

GCATTGGACTGGCTTCGAAGTTTC Rev $T_m = 59.1^\circ\text{C}$

Intron 1: 53 pb

Intron 2: 57 pb

Intron 3: 57 pb

Intron 4: 50 pb

Intron 5: 55 pb

Intron 6: 59 pb

cDNA: 820 pb

Genomic DNA: 987 pb

dmGr61a

CATGAAGACCTTGGTCGGTGCCAAT Fow $T_m = 61.5^\circ\text{C}$

TCTGCAACCAGGCGTTGGCTATTT Rev $T_m = 61.5^\circ\text{C}$

Intron 1: 60 pb

Intron 2: 49 pb

Intron 3: 52 pb

Intron 4: 56 pb

Intron 5: 57 pb

Intron 6: 51 pb

Intron 7: 58 pb

cDNA: 698 pb

Genomic DNA: 912pb

Répéteurs aux molécules amères (Gr66a, 93a et 33a)

dmGr66a (caféine)

AGCTGGAATTCTGCCACAGGATCT Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

ACCAGTTGACCGCGTTACGAAA Rev $T_m = 59.4^\circ\text{C}$

Intron: 61 pb

cDNA: 255 pb

Genomic DNA: 316 pb

dmGr93a (caféine)

GTGAGGCAGTCAGAAGTGCCAAAGA Fow $T_m = 61.2^\circ\text{C}$

TCAGTTCGGCATTACAGGTGG Rev $T_m = 64^\circ\text{C}$

Intron: 61 pb

cDNA: 227 pb

Genomic DNA: 288 pb

dmGr33a (inhibiteur des phéromones mâle, caféine)

CACTGAATCGCCAGCAATCGGAAA Fow $T_m = 60.4^\circ\text{C}$

TACAAACGGCGAGTTTGGACCACAG Rev $T_m = 61.7^\circ\text{C}$

Intron 1: 64 pb

Intron 2: 142 pb

Intron 3: 486 pb

Intron 4: 59 pb

cDNA: 923 pb

Genomic DNA: 1551 pb

Récepteurs aux phéromones (Gr68a, 32a et 33a)

dmGr68a:

TAACTGCGTGGCCGGAGTTTCATT Fow $T_m = 61.3^\circ\text{C}$

AAACAGGATCTTCAGTTCACCGCC Rev $T_m = 59.5^\circ\text{C}$

No intron

dmGr32a (inhibitory male pheromone)

CAGATTACCGGCAAGGGCATGGTTT Fow $T_m = 61.8^\circ\text{C}$

AAGGGTGTATGCCAAGTCGAAGGA Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

Intron1:56pb

Intron2:57pb

Intron3:74pb

[MATERIELS ET METHODES]

Genomic DNA: 226 pb
cDNA: 170 pb

Autres Grs

dmGr22e

AGAAACTAGA GAGAAGTATC ACGGACT Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

TA CCTGCTGTTC CTCATCCA Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

Genomic: 461pb
cDNA: 142pb

dmGr22f

AGTTAGAGAG AAGTTTGAAT G Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

ACATGGGCTT TCAAATGATC AT Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

Genomic: 495pb
cDNA: 113pb

dmGr28a

TGGACTACCG CAGGATACT Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

GAA ATCCTGCAGG ATATTTTGG Rev $T_m = 62^\circ\text{C}$

Genomic: 806pb
cDNA: 250pb

dmGr39a

GAGGCAA ATAAACAGC AAAGATGCTG Fow $T_m = 66^\circ\text{C}$

GCT TATGGATTTT TCGCTCTGGA Rev $T_m = 66^\circ\text{C}$

Genomic: 80pb
cDNA: 137pb

dmGr59f

CCCGAGGGA AAGACTATC Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

GATT GTTCGTCCTG GGCTC Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

cDNA: 205pb
Genomic: 800pb

dmGr93a

GCGATGGGATAAGAGTGTTGA Fow $T_m = 62^\circ\text{C}$

CAGTTCGGCATTACAGGTGG Rev $T_m = 64^\circ\text{C}$

cDNA: 164pb
Genomic: 463pb

Odor Binding proteins OBPs

dmObp19b

AGGACG CCAAGCACGA GAC Fow $T_m = 62^\circ\text{C}$

ACAAGTG CGAGGCAGCC CA Rev $T_m = 62^\circ\text{C}$

cDNA: 208pb
Genomic: 273pb

dmObp56c

CATTGCTTTGCCTCACTCT Fow $T_m = 58^\circ\text{C}$

CGATTGCTTT GTGAGCTGTC Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

cDNA: 285pb
Genomic: 311pb

dmObp56d

CCATTTCGGCTGCTGAGC Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

GAGGTCCAGCCCGATGTC Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

cDNA: 219pb
Genomic: 240pb

dmObp 57b

TTATTGCGCCTCTGATTTTGTI Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

AGAAGGCTCCCGAAGAACTT Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

[MATERIELS ET METHODES]

cDNA: 335pb

Genomic: 398pb

dmObp19d-PA pherome binding protein related 2

GAGGAGATCAACAGGGACCA Fow $T_m = 62^\circ\text{C}$

GTCAAGGTCATGAGCAAGCA Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

dmObp28a Pherome binding protein related 5

ACTGGTGCGAGCCTTTGAC Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

AGATTGCCCTGGAGATCGG Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

dmOBP69a Pherome binding protein related 1

AGGTGAGAAAGCTGCGAATG Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

GATGGCTGTGATACCGCTTA Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

dmObp83a Pherome binding protein related 3

TGGTCGGCGTGTCAAGTG Fow $T_m = 60^\circ\text{C}$

AGTTCAGCGATGGGGAGATT Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

dmObp84a-a Pherome binding protein related 4-a

GAATTGTGCCAGGGCTCTAC Fow $T_m = 62^\circ\text{C}$

CACTGGCGATTCCGTTGAG Rev $T_m = 60^\circ\text{C}$

RESULTATS

Functional gustatory receptors in *Drosophila* wings and their role in flight-associated chemoperception

Hussein Raad¹, Jean-François Ferveur², Julien Thibert², Neil Ledger¹, Maria Capovilla¹, Alain Robichon^{1*}

1 - UMR INRA/CNRS/UNS 7254, Institut Sophia Agrobiotech, 400 route des Chappes, P. O. Box 167, 06903 Sophia Antipolis, France

2 – UMR CNRS 6265/INRA 1324/Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

*Corresponding author : Alain.Robichon@sophia.inra.fr

Major category: neuroscience

Minor category: ecology

Short title: Functional gustatory receptors in *Drosophila* wings

ABSTRACT

When exploring ecological niches, insects can detect diverse families of molecules such as sugars, bitter molecules, toxins, water, carbon dioxide and various xenobiotics. We document the expression of some gustatory receptor genes in the wings of the fruitfly (*Drosophila melanogaster*), one aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and the honeybee (*Apis mellifera*), suggesting that insects taste potential food molecules during their flight. The apparent universality of insect wing gustatory receptors supposes a major role associated to flight, but their functionality is presently unknown. We demonstrate that the nerve of the *Drosophila* wing anterior margin responds to both sweet and bitter molecules through an increase of the cytosolic Ca^{2+} levels. In genetically modified flies presenting transformed wing chemosensory cells, both preferential orientation behavior and Bayesian conditioning to food odors/tastants are affected. We hypothesize that during their stationary flight over a food source, insects nebulize molecules which are funneled by the air vortex over the wing margin chemosensors. This would allow sampling potential food sources without the risk of ingesting toxic substances, increasing fitness.

INTRODUCTION

Insects seem to have gained functional flight ability 350 million years ago during the [Carboniferous period](#) (Grimaldi and Engel, 2005; Godunko et al., 2011). The exquisite insect wing neurosensory system dedicated to guidance and potentially chemodetection (Hartenstein and Posakony, 1989; Stocker, 1994) constitutes a spectacular achievement of an evolutionary process allowing highly efficient flight and aerial space conquest. Wing neuronal elements are organized to allow the optimal environment perception through the air vortex that spirals off along the wing anterior margin during flight and the subsequent capture and detection of molecules trapped in this micro whirlwind (Dickinson et al., 1999; Dickinson, 2006). Insect species share an anterior wing margin nerve equipped with mechano- and chemo-neurosensory cells, as an universal neuroanatomical feature (reviewed in (Stocker, 1994). In *Drosophila melanogaster*, the anterior margin of the wing basically harbors two types of bristles disposed in three rows:

[RESULTATS]

mechanosensory stout bristles and slender chemosensory hairs (Figure 1A). The axons of all mechanoreceptor and chemoreceptor neurons housed in these bristles make intertwined bundles, constituting a unique nerve along the anterior wing margin routing towards the thoracic ganglion (Hartenstein and Posakony, 1989; Couso et al., 1994; Stocker, 1994). The chemosensory cells in insect wings harbor gustatory receptors (Grs) and seem to be dedicated to taste perception (Stocker, 1994). However, the function of these Grs remains hypothetical and their presence in wings appears intriguing regarding their association to flight.

In mammalian models, sweet-sensitive neurons transduce signals relying on receptor binding by an increase of the second messengers cAMP and Ins(1,4,5)P3 (Kinnamon, 2000; Lindemann, 2001; Kinnamon, 2012). The two transduction pathways can co-exist in the same cells and their activation depends on the molecular type conferring the sweet sensation (Amrein and Bray, 2003; Zhang et al., 2003; Medler, 2010). An increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration occurs in both pathways, coming from an uptake from the extracellular space through voltage-gated calcium channels controlled by cAMP levels (Kinnamon, 2000; Lindemann, 2001; Margolskee, 2002; Medler, 2010; Sato et al., 2011; Kinnamon, 2012) or alternatively coming from intracellular stores opened by Ins(1,4,5)P3 binding to its receptors (Lindemann, 2001; Margolskee, 2002). Membrane depolarization by inhibition of a K^+ conductance appears to be the resulting effect of the two pathways (Kinnamon, 2000; Lindemann, 2001). On the other hand, in mammals the transduction cascade of the bitter molecules involves G protein-coupled receptors. These latter activate phospholipase C leading to Ins(1,4,5)P3 increase and consequently intracellular Ca^{2+} stores opening followed by membrane depolarization (Lindemann, 2001; Margolskee, 2002; Amrein and Bray, 2003; Zhang et al., 2003; Medler, 2010). In parallel, this pathway is known to activate a phosphodiesterase (PDE) through a $G\alpha$ -protein (*gustducin*) (Margolskee, 2002).

Gustatory receptor transduction in invertebrate models appears more complicated and the mechanisms are still debated (Vosshall and Stocker, 2007; Kent and Robertson, 2009; Weiss et al., 2011). *Drosophila* Grs clearly belong to the family of seven trans-membrane domain proteins, but sequence homologies with the mammalian taste receptors are very weak (Hallem et al., 2004; Vosshall and Stocker, 2007). Basically, the question whether insect *Gr* receptors mediate a signal transduction via an heterotrimeric G protein (metabotropic model) or a ligand-gated ion channel (ionotropic model) is currently unsolved and is addressed by authors with divergent views (Nakagawa and Vosshall, 2009). Many of the 68 *Gr* genes detected in the *Drosophila* genome have

functions that appear not related to taste (Montell, 2009). Some are expressed in olfactory neurons of antennae (Dunipace et al., 2001) or are involved in CO₂ detection (Fischler et al., 2007). One Gr present in sensilla neurons responds to water, suggesting that a dilution of ionic force in the bristle hemolymph could activate this receptor (Inoshita and Tanimura, 2006). Moreover, the presence of *Grs* in the hygrosensitive neurons of the arista, in oenocytes and in the auditory Johnston's organ leads to the observation that *Grs* might fulfill numerous non-gustatory functions (Thorne and Amrein, 2008). These findings suggest a lack of clear-cut boundaries between multiple sensory systems in insects. Although the anterior wing margin of *Drosophila* shows chemosensory sensilla equipped with Grs, up to date physiological or behavioral studies have not proved yet their role in taste signaling pathways.

Here, we report the existence of Grs expressed in wings of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, the aphid *Acyrtosiphon pisum* and the honeybee *Apis mellifera*, suggesting the universality of this neurosensory mode. Using an engineered fly expressing an hybrid GFP/calmodulin (CaM)/M13 (G-CaMP) molecule in which fluorescence is drastically increased upon calcium binding (Nakai et al., 2001; Akerboom et al., 2009), we show the functionality of Grs for detecting sweet and bitter molecules in the *Drosophila* wing. Using genetically modified flies in which chemosensory cells are specifically altered in wings, we also characterize the role of *D. melanogaster* wing gustatory cells in chemosensory orientation and exploration behavior.

RESULTS

Genetic manipulation of wing chemosensory organs

To characterize the function of wing chemosensory organs, we targeted to the wing the expression of either a transgene with a calcium-GFP sensitive reporter to visualize *in vivo* the activity of these organs (Nakai et al., 2001) (Figure 1A) or a second transgene with the dsRNA directed against the *Pox neuro* gene (*UAS-Poxn* RNAi) (Dietzl et al., 2007). The latter strategy allowed us to transform these chemosensory cells into mechanosensory cells during pre-imaginal development (Nottebohm et al., 1992; Boll and Noll, 2002). To target these transgenes, we used a PGAL4 driver transgene (hereafter named *Wing-GAL4*) exclusively expressed in the larval wing imaginal disc and in neuronal cells located along the anterior margin of the adult wing (Figure

[RESULTATS]

1B) (See annex A, Figure A3). We verified that the *Poxn* transformation of targeted wing cells in *Wing-GAL4>UAS-Poxn* RNAi flies (*Poxn**) abolished the expression of taste related proteins such as the gustatory G protein-coupled receptor *Gr43a* in the adult wings whereas a major odorant-binding protein gene (*Obp56d*) was unaffected (Figure 1C). This indicates that the *Wing-GAL4* driver can be used for genetic manipulation in behavioral studies.

FIGURE 1

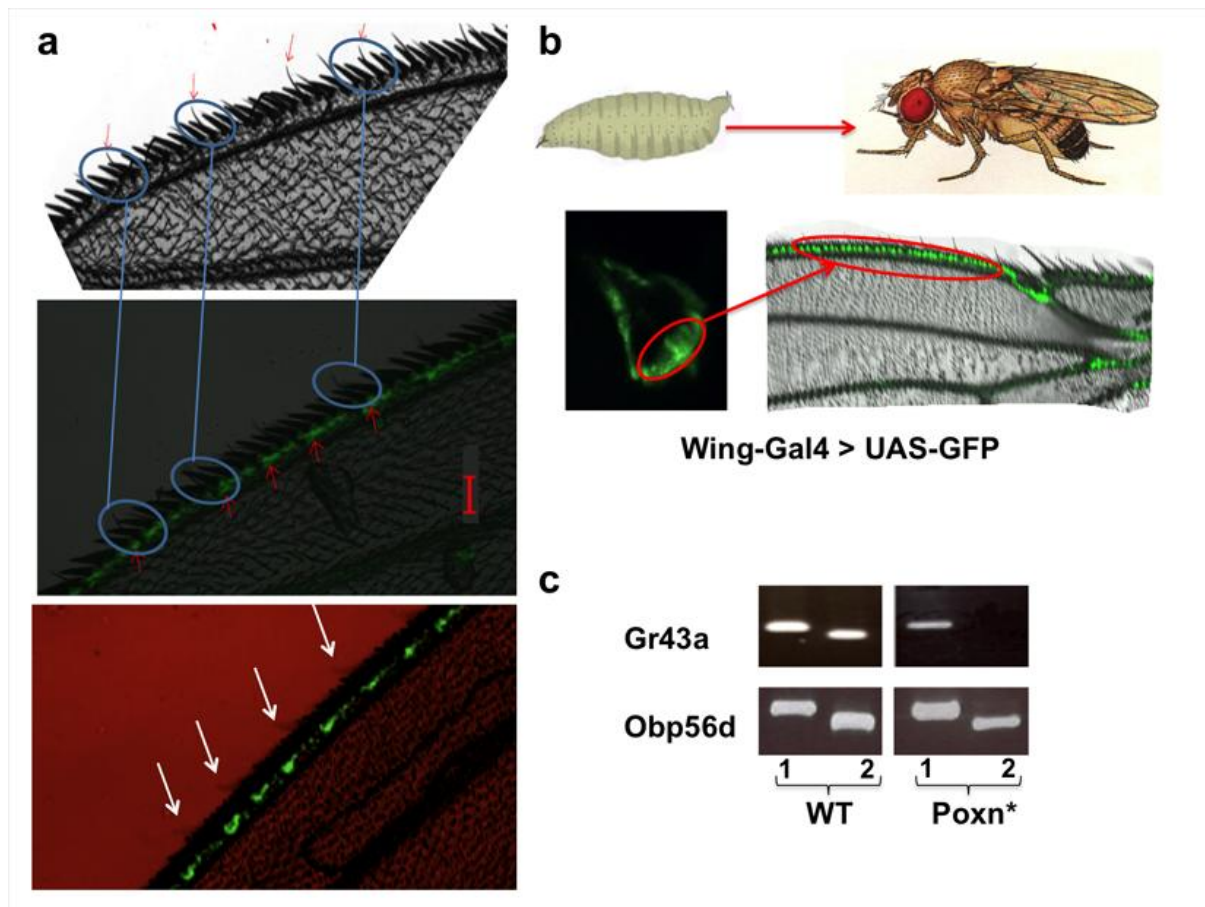


Figure 1. Genetic targeting of the Grs in adult *Drosophila* wings.

(A) The G-CaMP calcium sensor was expressed in *tub-Gal4>UAS-G-CaMP* flies. (*Top*) The picture shows the details of the wing anterior border. Stout bristles house mechanoreceptors and slender hairs (blue circles) house chemo-receptors (pointed from above by red arrows). (*Middle*) Upon sweet or bitter stimulation, the fluorescence diffuses in the axons of the wing anterior margin (red arrows in correspondence to slender hairs inside blue circles; see also videos 1 and 2 in Supplementary Data to follow the kinetics). (*Bottom*) The fluorescence spots triggered by sugar fit with the location of slender hairs (white arrows). (B) The *Wing-GAL4* transgene drives GFP expression in the wing imaginal disk of the larva and in the nerve of anterior wing margin of the adult. (C) The *Wing-Gal 4* targeting *UAS-RNAi Poxn* (*Poxn**) specifically abolishes the expression of Grs (for example, Gr43a) but not of Obps (such as Obp56d) in the adult wing. The PCR analysis of transcripts is shown for wing genomic DNA (1) and RNA (2). In this and the following figures, WT indicates the wild-type genotype.

Taste receptor and odorant binding protein (Obp) genes are expressed in the wings of different orders of insects

Specific structural features that distinguish olfactory, gustatory and other families of seven trans-membrane receptors are well known and can be determined through the reading of their DNA sequences (Dunipace et al., 2001; Scott et al., 2001; Fischler et al., 2007; Vosshall and Stocker, 2007; Benton et al., 2009). Our goal consisted to detect the presence of RNAs coding taste-related receptors in the wings of three phylogenetically divergent insects: *D. melanogaster*, *A. mellifera* and *A. pisum* used as generic models for the Diptera, Hymenoptera and Hemiptera orders, respectively. First, we searched for genes coding Grs and Obps in the sequenced and annotated genomes of the three species. Then, we designed a strategy to detect the cDNAs corresponding to these genes (see Methods section and Supplementary Text S1). As shown in figure 2, receptors for sugars (trehalose, fructose and glucose: *Gr64a-f* and *Gr43a*), CO₂ (*Gr21a* and *Gr63a*) and bitter molecules (*Gr32a*, *Gr22f*, *Gr28a*, and *Gr59f*) were found to be expressed in adult *Drosophila* wings. A large series of *Grs* (mostly sweet and bitter receptors: *Gr2*, *Gr3*, *Gr15*, *Gr16*, *Gr22*, *Gr30* and *Gr34*) and *Obps* was also found to be expressed in the adult wings of the aphid *A. pisum*. Similarly, in the honeybee wings, several *Grs* and *Obps* were also unambiguously expressed (Figure 2). This suggests that the wings of these three insects are potentially able to detect chemical cues from the environment. RT-PCR analysis shows the expression of *Gr64f*, *Poxn* and *Obp56d* in the adult and the embryo of *drosophila*. (See Annex A, figure A4).

FIGURE 2

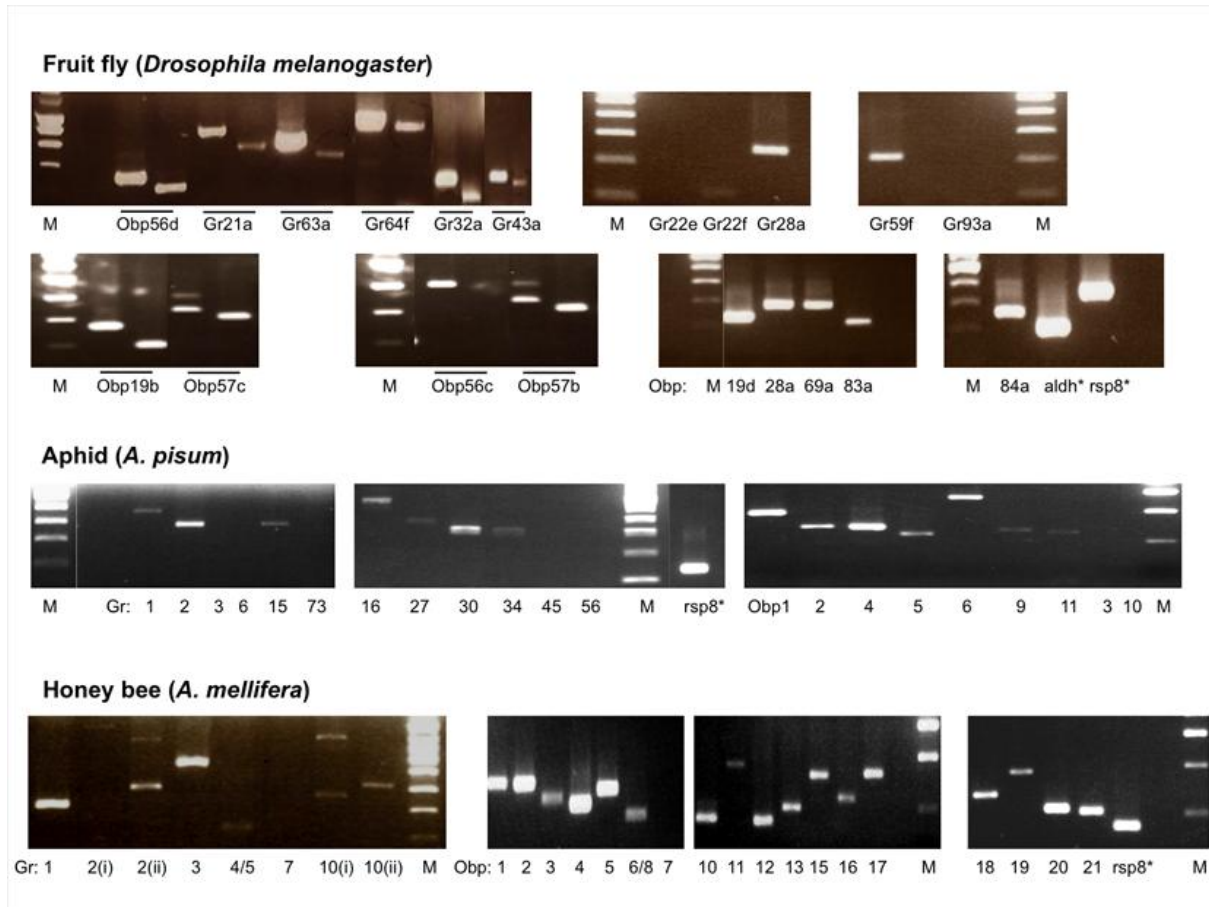


Figure 2. PCR analysis of transcripts in the adult wings of three insects.

The presence of RNA coding *Gr* and *Obp* proteins was assessed by RT-PCR in the wings of three insects: *Drosophila melanogaster* (top), *Acyrtosiphon pisum* (middle) and *Apis mellifera* (bottom). Total RNA was extracted from wings and cDNA was synthesized before performing the PCR analysis. When two near bands are shown for a single gene, they correspond to the genomic amplification (left) and to the cDNA (right). When only one band per gene is shown, it corresponds to the cDNA without ambiguity regarding a possible genomic contaminant. *Gr*s and *Obps* are expressed in these three insect species. The gene nomenclature can be found in the NCBI genome bank. M indicates the DNA marker.

cAMP determinations with sugars, bitter molecules and grape juice odors

If hydrophilic (non volatile) molecules are known to mediate taste perception in mammals, some airborne molecules can also stimulate Grs in insects (Dethier, 1972) likely *via* a complex with Obps (Ozaki et al., 2003; Tsuchihara et al., 2005). Therefore, we checked whether the exposure to grape juice odorants (without physical contact with the wing) could stimulate cAMP production in isolated wings. We found a slight elevation of cAMP in wild-type (*Canton S*) wings exposed to grape juice odorants which was decreased, but not abolished, with the *Poxn** transformation (Figure 3A). In contrast, the level of cAMP strongly increased in wings incubated with glucose, but remained unaffected by the stimulation with a bitter stimulus (quinine). As expected, the level of cAMP triggered by glucose was significantly reduced in *Poxn** wings (Figure 3B). A slight elevation of cAMP was observed in *Poxn** wings stimulated by quinine and this was not found in wild-type and *Wing-GAL4* controls (Figure 3B). Glucose-stimulated wings showed a lesser cAMP increase in the transgenic line *Wing-GAL4* compared to the control wild-type strain, suggesting a non neutral effect of the P-element insertion. Altogether, these data also suggest that volatile molecules can be residually active on Grs and confirm that cAMP is involved in sugar taste although the transduction mechanisms remain elusive.

FIGURE 3

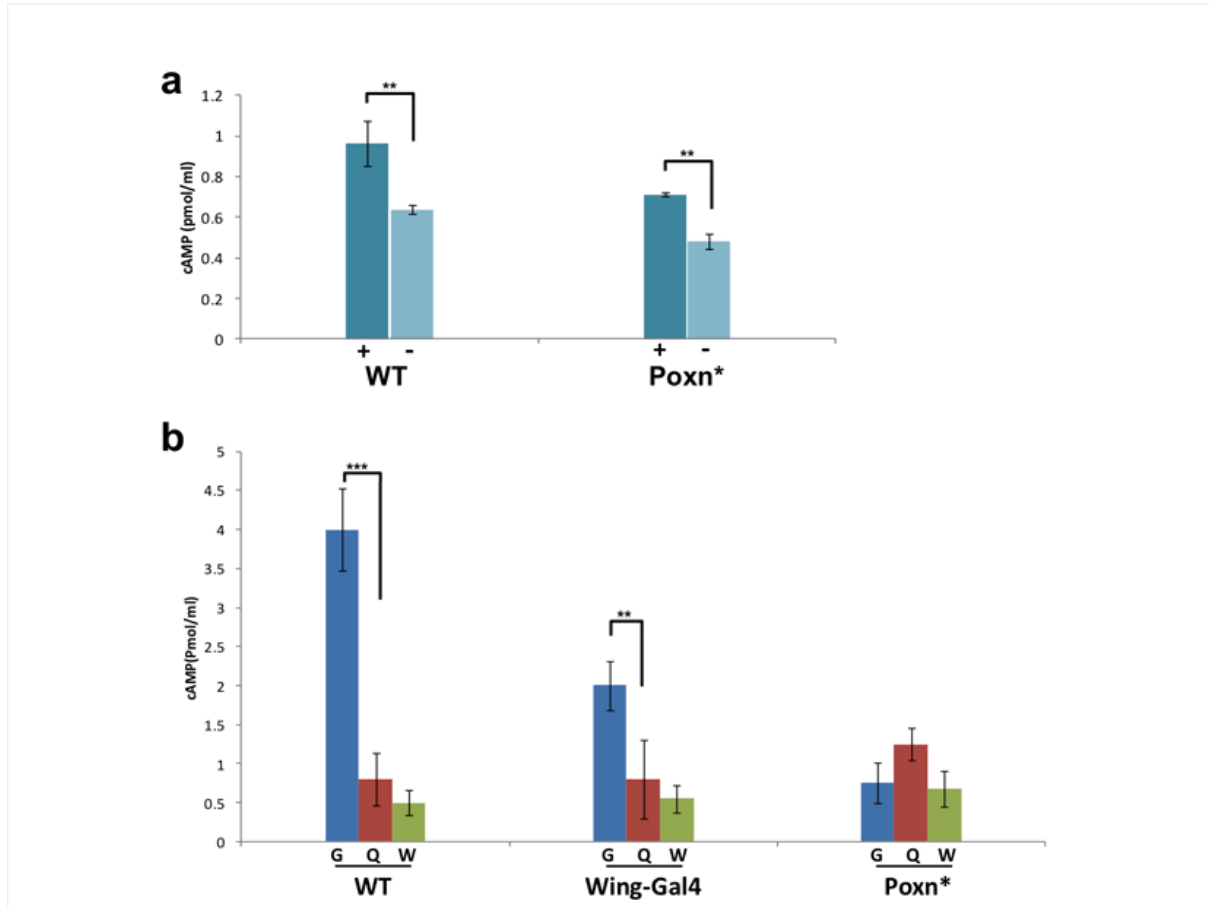


Figure 3. Dosage of cAMP in *Drosophila* adult wings after chemosensory stimulation.

The level of cAMP in wings was measured in three genotypes: wild-type (WT), *Wing-GAL4* and *Wing-GAL4>UAS-RNAi Poxn* (*Poxn**). Bars represent mean \pm sem for 5 separate experiments. Significant differences were determined with the non parametric Tukey test: *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ (see Supplementary Text S2). (A) Flies were exposed (+) or not (-) to odor grape juice and wings were cut off prior to the dosage. The small increase of cAMP triggered by odor observed in wild-type flies is reduced in *Poxn** flies. (B) Cut-off wings were immersed in a 100 mM glucose solution (G), in a 100 mM quinine solution (Q) or in water (W) for 10 minutes at room temperature. Then, their cAMP levels were measured. The significant increase in cAMP levels triggered by glucose in control genotypes is abolished in *Poxn** flies.

Wing taste organ stimulation by sweet and bitter molecules is mediated by a strong increase of cytosolic Ca^{2+}

Next, we checked whether different odorant and taste stimuli are able to induce calcium peaks in wing chemosensory organs. G-CaMP is an engineered protein acting as a calcium sensor (Nakai et al., 2001). This protein is a fusion of the M13 domain of a myosin light chain kinase, calmodulin (CaM) and a modified GFP. Briefly, when the calmodulin binds calcium, the complex binds M13 and the modified GFP emits a strong fluorescent signal. In the absence of calcium, calmodulin and M13 are dissociated (Nakai et al., 2001). In this case, the modified GFP molecule is disorganized and emits a weak signal. Confocal microscopy observations coupled with kinetic measure of fluorescence were carried out in the wings of *tub-Gal4>UAS-G-CaMP* flies (see figure 1A and Methods). Wings stimulated with water show a basal level of faint fluorescence, as unstimulated wings (Figure S1 and data not shown) moreover wings of the transgenic fly: G-CaMP/y ; UAS-Poxn/+ ; Tub-Gal4/+ (see annex A for the genetic strategy to obtain the construct) show a basal level of fluorescence after treatment with both glucose or denatonium (see annex, Figure A1, A2). We tested several sweet-tasting molecules including the monosaccharides fructose and glucose (Figure 4 and figure S2), in addition to trehalose (Figure S2), the disaccharide sucrose and also some glycosylic conjugates such as hesperidin (flavonone glycosides), arbutin (a phenol linked to glucose) and Steviol glycoside (a sweetener) (data not shown). Glycosylic compounds were analyzed since they constitute the hydrophilic precursors of aroma in fruits and flowers (Loughrin et al., 1992). All monosaccharides triggered some rapid flashes of light which were localized at the basis of the slender hairs and superposed to the fluorescent background of the anterior wing margin (Figure 4; see video 1 in Supplementary Data). Note that the latency of the peaks of activity varied, likely due to our experimental constraints and physical properties of the droplets of tastants (concentration, density, viscosity and temperature, see Methods). Three patterns of flashes were observed. First, some cells lighted up/turned off without apparent synchrony (Figure 4A). Second, in some other cases, during the peak of fluorescent emission, a slight signal diffused at the basis of the mechanosensory hairs suggesting neuronal connections between the two types of sensory cells (Figure 4B). Third, a strong fluorescent signal fading with time was observed in the anterior margin nerve (Figure 4C).

[RESULTATS]

Conversely, neither saccharose, nor the glycosidically bound compounds, nor any odorant among those tested (benzaldehyde, ethyl acetate, ethanol) did trigger observable calcium changes (data not shown).

On the other hand, the effects of two bitter compounds (quinine and denatonium) were thoroughly investigated (Figures 5 A and B). Both quinine and denatonium stimuli induced a series of strong fluorescence flashes along the wing anterior margin highlighting the calcium diffusion in axons (see video 2 in Supplementary Data). This phenomenon was enhanced with the bitter stimuli compared to sugars suggesting a predominant sensitivity of the wing gustatory organs to bitter molecules. Note that the delayed fading of the fluorescence peaks, compared to the real calcium peaks, might be a bias possibly due to a strong *in vivo* affinity between calcium and G-CaMP. This might explain the slower return of calcium to its basic level. The strong and persistent concentration of sugar/bitter stimuli *in situ* may also enhance the intensity and the width of the fluorescence peaks. Finally, the regulation of calcium might be modified in isolated wings as compared to wings attached to live animals even if its functionality seems to be preserved. In summary, sweet and bitter stimuli provoked two types of calcium variation responses: a very brief and intense peak followed by a sustained elevation.

FIGURE 4

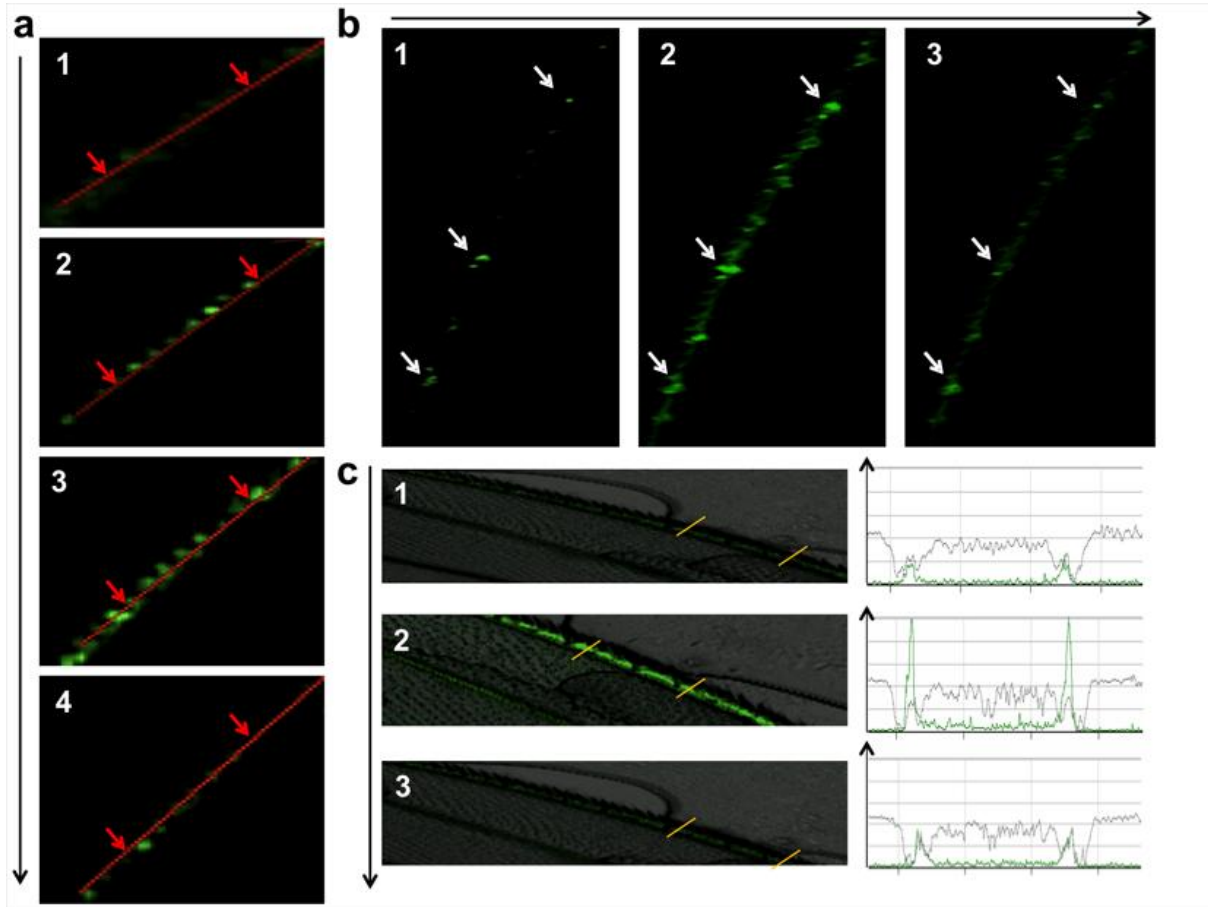


Figure 4. Sugar-induced variation of the calcium peaks in the anterior wing margin nerve.

The G-CaMP calcium sensor was used to visualize the calcium peaks with the GFP fluorescence in *tub-GAL4>UAS-G-CaMP* flies in response to 100 mM glucose (A, B) or 100 mM fructose (C). See the Methods section for details. The three-four photographs shown for each panel represent consecutive steps. (A) The fluorescent signal highlights chemosensory receptors, which light up/turn off without synchrony (red arrows indicate the same location from one sequence to the other). (B) Mechanoreceptors are also visible (faint spots) between chemo-receptors (white arrows), suggesting possible axo-axonic connections between the two types of neuronal cells. (C) The yellow lines on the left cutting the edge of the wing margin correspond to the green traces shown on the right that represent the measured intensity of fluorescence *versus* a visible light

[RESULTATS]

background (gray traces; 600 nm). Glucose and fructose treatment increase calcium in chemosensory cells of the wing.

FIGURE 5

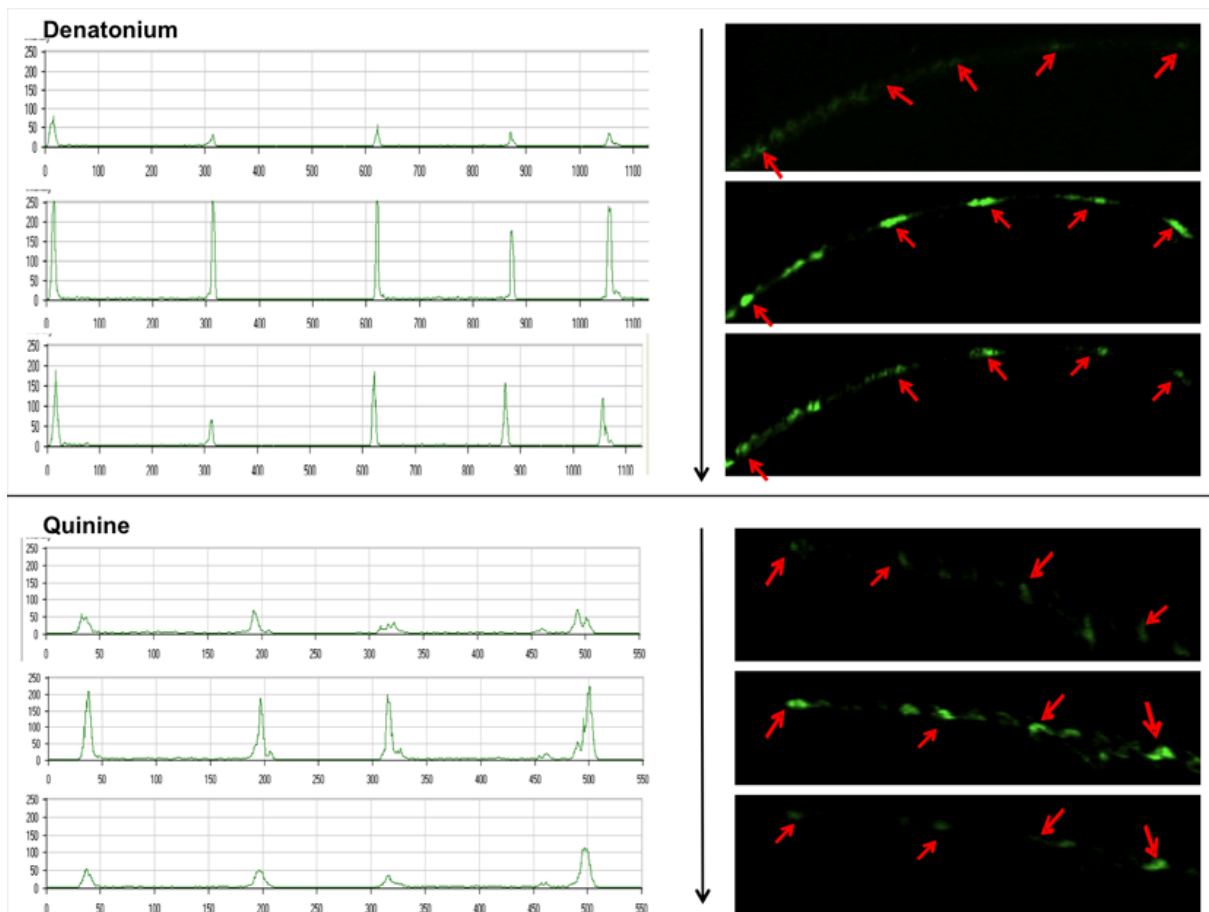


Figure 5. Bitter-induced variation of the calcium peaks in the anterior wing margin nerve.

A similar protocol as the one described in figure 4 was used to measure the response of wing chemosensory organs to 100 mM denatonium (*top*) or quinine (*bottom*). For each substance, three consecutive photographs were taken. The red arrows highlight the peaks of fluorescence in chemosensory cells. The intensity of the measured fluorescence in these sites is shown on the left (green traces). An increase of calcium is observed after denatonium or quinine exposure.

Manipulation of wing chemosensors and orientation behavior

To validate the function of wing chemosensory organs and the effect of their genetic transformation, we measured the ability of flies to orient in an odorant panorama. The behavior of single flies was analyzed in a chamber pierced with four entries: one entry received a constant airborne flux of fresh grape juice odor (odorant side) whereas the opposite-side entry received an odorless air flux of similar strength (control side - the two other entries were necessary for air exit; Figure 6 A). We compared the time that each fly spent moving inside two delimited areas in the odorant and control sides. The wild-type strain spent more time in the odorant area than in the control area ($p < 0.001$), indicating an attractive effect of the odorant stimulus. The two transgenic heterozygous controls (*UAS-Poxn RNAi/+* and *Wing-Gal4/+*) showed a similar preference, but with a lower significant preference ($p < 0.05$). In contrast, flies with transformed wing chemosensory organs (*Poxn**) did not distinguish the two areas ($p = \text{ns}$). Since the other non-wing related olfactory and gustatory systems are intact, this indicates that the wing Grs specifically altered in *Poxn** are important for fly orientation in an odorant panorama. This effect was not caused by a general behavioral defect since the locomotor activity of the *Poxn** flies was not decreased compared to control flies (Figure S4).

Bayesian conditioning

We also investigated the role of wing Grs in relation to the ability of food search following Bayesian food conditioning (Figure 6B). We compared the performance of the wild-type and *Poxn** genotypes. During the Bayesian conditioning phase, groups of flies were left for three hours in contact either with grape juice (fermented or fresh) or with a control solution (water *plus* sugar). Then, the three types of conditioned flies were transferred to a test chamber containing a fresh grape juice source, and their accumulation near the source was measured (Figure 6B). The accumulation of the flies conditioned with the two qualities of grape juice (fermented *vs* fresh) was standardized with the value obtained with sugar-conditioned flies. Our data reveal that the strong behavioral difference noted for wild-type flies conditioned with fermented *vs* fresh juice (based on aggregation rate) was abolished in *Poxn** flies. This strongly suggests that the wing chemoperception influences the Bayesian exploratory skills in relation to a previous experience.

FIGURE 6

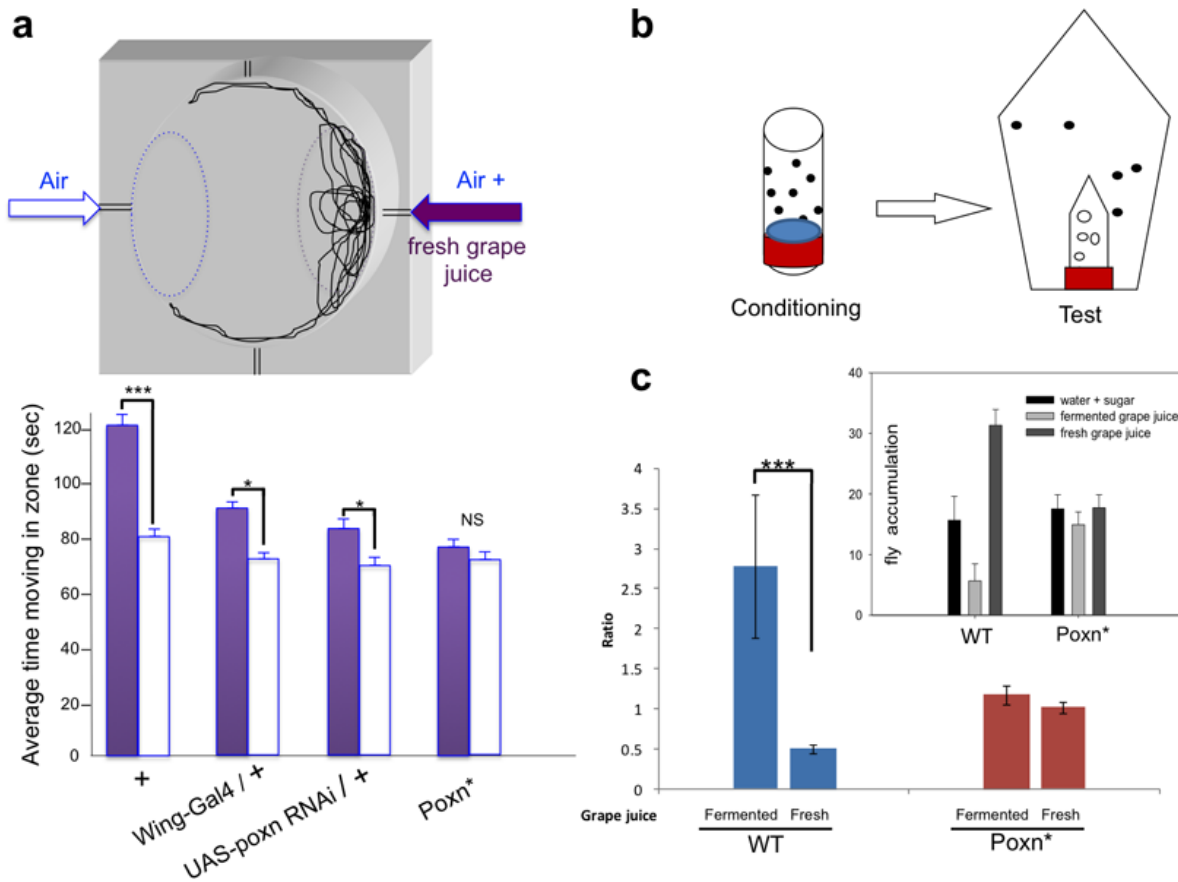


Figure 6. Role of wing chemosensors in orientation behavior and Bayesian conditioning by food sources.

(A) Orientation behavior. (Top) Single female flies were placed in an arena where one entry received air with fresh grape juice (right) and the opposite entry received only air (left). Two virtual areas corresponding to each entry were delimited (dotted lines). The black line is the trajectory of a single fly. (Bottom) Bars represent the average time (\pm sem) spent moving in the grape juice area (violet) or in the air area (white bars) and measured with the Ethovision® tracking software during 5 minutes. Four genotypes were tested: a wild-type strain (+), the two transgenic lines crossed to the wild-type background (*Wing-Gal4/+* and *UAS-Poxn/+*) and the experimental genotype *Wing-GAL4>UAS-Poxn RNAi* (*Poxn**). $n = 64-72$. *Poxn** flies do not have a preference for the grape juice area as the wild-type and heterozygous controls. Statistic

[RESULTATS]

analysis was performed with the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. (B) Bayesian conditioning. Flies were mass-conditioned with fresh grape juice, fermented juice or water *plus* sugar for three hours and subsequently released in a cage where their accumulation in a food vial with fresh grape juice was measured. (C) Grey and black bars represent the number of flies \pm sem that accumulated in the test tube. Blue and red bars represent the mean ratio \pm sem of the control sugar *versus* conditioned fresh grape juice or fermented grape juice for *Wing-GAL4>UAS-Poxn* (*Poxn**) and control flies (WT). The food preferences of wild-type flies are not observed in *Poxn** flies. Statistical analysis was performed with a Tukey non-parametric test: *** $p < 0.001$ (see also Supplementary Text S2). $n = 15$.

DISCUSSION

In *Drosophila*, sensilla with gustatory receptor neurons are present on the labellum, tarsi, wing margin and ovipositor (Hartenstein and Posakony, 1989; Stocker, 1994). To our knowledge, no deep studies have investigated the molecular mechanisms underlying the role of inherent wing sensory cells in the detection of food molecules such as sweet and bitter compounds. On the other hand, several studies have reported that insect *Grs* lack the canonical structural elements observed in G-protein coupled receptors, and more specially the domain of G protein binding. This led to hypothesize that these molecules act as ion channels instead of receptors regulating cyclase or phospholipase C (Vosshall and Stocker, 2007; Nakagawa and Vosshall, 2009). With their inversed topology in membrane, insect olfactory receptors (*Ors*) likely dimerize with *Or83b* so that they act as coreceptors (Benton et al., 2006; Wicher et al., 2008). These features might be also relevant to *Grs* in insects. The intriguing neuroanatomy which associates *Grs* with mechanoreceptors at least in two different vibrational systems (the Johnston's organ for hearing and the anterior wing margin nerve for flight) led to the hypothesis that these molecules are not related to taste function. This idea was re-enforced by the suggestion that some *Grs* are activated by endogenous ligands (Montell, 2009). In such prospect, it was conceivable that wing vibrations of a certain range (from 50 to 2000 Hertz) provoke the binding to *Grs* of endogenous molecules present in the bristle hemolymph.

In this report, we show that wing chemosensory cells are fully functional and respond to tastants such as sweet and bitter molecules. Our data fit with all the different scenarios involving the contribution of both calcium and cyclic nucleotides to the transduction signaling of insect *Ors* and *Grs* (Murakami and Kijima, 2000; Ishimoto et al., 2005; Wicher et al., 2008; Deng et al., 2011). We show that the wing *Grs* respond to diverse monosaccharides and bitter molecules through Ca^{2+} and cAMP level variations. We confirm the existence of a cAMP pathway in sugar transduction and, even if the mechanisms are not completely elucidated, our data support any of the following hypotheses: (i) the secondary activation of a calcium calmodulin stimulates type 1-cyclase (Ferguson and Storm, 2004); (ii) activation of the α -subunit of G proteins occurs through the heterodimerization of *Grs* with an unrelated G protein-coupled transmembrane proteins (Wicher et al., 2008); (iii) calcium/cyclic nucleotides signaling occurs through a novel family of seven transmembrane domains for which the molecular mechanisms are still unknown (Nakagawa

[RESULTATS]

and Vosshall, 2009). Moreover, several reports have also suggested that volatile compounds can stimulate insect Grs likely through the odor/Obp complex (Ozaki et al., 2003; Tsuchihara et al., 2005).

We therefore propose that insects, especially pollinator ones, taste flowers through their stationary flight. The wing beat creates an air vortex allowing the engulfed material to come in contact with chemoreceptors. The thermodynamic properties of the insect wing beat (Dickinson et al., 1999; Dickinson, 2006) support the wing neuroanatomy of chemoperception (Hartenstein and Posakony, 1989; Stocker, 1994). Since the insect wing flapping ranges from 50 to 2000 Hertz (beats per second) (Price, 1984), we anticipate that this could nebulize and/or spray microdroplets, dust particles which should be in turn engulfed in the “leading edge vortex” that spirals off along the anterior wing margin to be addressed to Grs. This scenario might really occur in the sense that, if proved, the pollinator insects would taste flowers with their wings, allowing them to perceive sugar and bitter molecules without the need of landing, making their exploratory process highly efficient. This should prevent digestive intoxication caused by noxious molecules, occurring when the food sources are tasted through proboscis extension.

At this point, little is known about the coincidental mechanisms involving both mechanoreceptors and chemo-receptors of the insect anterior wing margin. Networks of different sensory modalities underlie the complex coincidental signaling that orchestrates animal behavior (Shadlen and Movshon, 1999; Singer, 1999; Benayoun et al., 2010). Although mechano- and chemosensitive neurons are spatially separated along the wing border, they may burst in synchrony following mutual stimulation by air friction and chemical capture. This simultaneous sensory processing of mechano- and chemoreceptors may create a complex coincident and coded influx that propagates in the wing margin nerve towards the central nervous system.

Furthermore, the close examination of our data (showing fluorescence along the axonal nerve; figure 4B2) together with the wing neuroanatomy architecture suggest that electrical synapses exist between neurons through their axo-axonic connections inside the unique nerve assembly (Schmitz et al., 2001; Bennett and Zukin, 2004; Debanne, 2004). Electrical synapses are characterized by a high speed of transmission and are consequently involved in escape reflex and other behavioral processes that require extremely fast responses (Bennett and Zukin, 2004; Debanne, 2004), but very little is known known about electric synapses, axo-axonic connections and gap junctions in the neuronal architecture of the insect wing anterior margin. Since local

[RESULTATS]

axonal interactions are known to facilitate the fast synchronization of neuronal depolarization (burst firing) (Debanne, 2004), a diffusion of calcium in the wing axons might explain the synchrony of the complex spatial and temporal information during insect flight.

Through the insect wing organ, the interspersed of chemosensory and mechanosensory cells has been conserved by evolution and sophisticated behaviors regarding exploration, guidance and sampling of the environment have emerged. The powerful genetic tools available in *Drosophila* should contribute to unravel the mechanisms underlying this fascinating organization of neurosensors.

METHODS

Drosophila strains

The Wing-GAL4 line corresponds to [w\[*\]; P{w\[+mC\]=Ser-GAL4.GF}1 P{Ser-GAL4.GF}2](#) (Bloomington n. 6791). The RNAi line to inactivate *Poxn* (CG8246) was obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (Dietzl et al., 2007). For all experiments, *Canton S* is the wild-type control.

PCR analysis of wing extracts

300 pairs of wings for *Drosophila* and aphids, and 50 pairs of wings for honeybee, were dissected and immersed in liquid nitrogen. The material was grinded in a mortar with a pestle until evaporation. The powder was then extracted for mRNA content with the RNeasy[®] Micro Kit (QIAGEN[®]). This material was used as template for cDNA synthesis with the superscript[™]II Rnase H Reverse transcriptase kit (Invitrogen[®]). PCR reactions were performed with a Thermal Cycler Eppendorf A.G. (Hamburg Germany). Amplification was performed with 10 ng DNA in final volume of 50 µl with 1 U of UPittherm DNA polymerase (Uptima), 1µl of 10X buffer reaction and 20 µM dNTP master mix. The following steps are: denaturation of DNA at 94°C for 2 min, 35 cycles with a denaturation step of 30 seconds, hybridization for 45 seconds at the T_m, elongation for 1 min and 30 sec at 72°C and a final elongation for 8 min and 30 sec. After migration in 1% agarose in 0.5X TBE buffer, bands were visualized under UV.

cAMP determination

Two types of experiments were carried out. First, flies were placed in a vial with a nylon mesh preventing their physical contact with the juice. For conditioning, flies were kept with grape juice odors for 2 hours (or with water for control experiments). To preserve the effects of odorants on cAMP levels, the conditioning phase was conducted with groups of 20 to 30 flies, and then flies were immediately frozen in liquid nitrogen. The wings of two hundred frozen flies were subsequently dissected with a razor blade (while maintaining flies frozen during the operation) and immediately immersed in liquid nitrogen. This accumulated material was grinded in a mortar with 1 ml/0.1 g of tissue of 0.1 M HCl after evaporation of the liquid nitrogen. The following steps were followed as indicated in the Enzo Life Sciences cAMP complete EIA kit in order to quantify cAMP content in wings. The cAMP content in wild-type and *Poxn** wings was compared. Second, wings were dissected and immediately immersed in a solution of 1 M glucose for 10 minutes and frozen in liquid nitrogen. 200 pairs of wings were grinded after liquid nitrogen evaporation as indicated above. The cAMP levels were compared between wild-type and *Poxn** flies (n = 5) using the non-parametric statistical test *Tukey* (see Supplementary Text S2).

Calcium kinetics

The G-CaMP system (Nakai et al., 2001) was introduced in a transgene (*UAS-G-CaMP*) which we targeted with the ubiquitously expressed *tub-GAL4* driver line. If many Gal4 lines induced a weak or null fluorescent signal regarding the wing neuronal system, the *tub-GAL4* driver induced a strong signal in the wing neuronal cells but not in the other wing cells. The wings of 5-day-old *tub-GAL4>UAS-G-CaMP* flies were cut with a razor blade, mounted in water between a glass slide and cover slip which was placed on the platform of the confocal microscope a ZEISS LSM 510 META and observed with a 20x objective. A drop of the sugar/bitter solution (100mM in water) was put on the edge of the cover slip and the time course of the fluorescence variation was recorded in real time. The figures shown here represent few sequences of each movie.

Chemo-oriented behavior

A behavioral arena was designed to prevent *Drosophila* to fly. It was 30 cm in diameter and 7 mm in depth and made of a plastic structure placed in a sandwich between two glass plates so that the orientation and searching activity triggered by chemical stimuli resulted only in walking abilities (Arthaud et al., 2011). Four holes (2 mm in diameter) were pierced at equidistance in the arena and one was connected to the odorant source. A 40 ml glass syringe loaded with 10 ml grape juice and connected to a syringe pump pusher was used to generate a gradient of odorants in a controlled manner (2 ml/minute) (Arthaud et al., 2011). Two virtual areas of ellipsoid shape (one receiving the odor and the second one receiving only air) were delimited ($1/6^{\text{th}}$ of the arena surface). Flies were starved for two hours and placed in the arena 15 min before the start of the experiments. The trajectometry of individual 5-days old flies was measured during 5 minutes with a camera connected to dedicated software (Ethovision XT, Noldus Information Technology). This allowed us to measure several parameters including the duration of locomotion inside each of the two virtual areas. Statistics were performed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Bayesian conditioning

First, forty male and/or female flies (7- to 8-days old) were placed in vials (30 ml) to be conditioned by physical contact with a liquid stimulus (either fresh or fermented grape juice or water *plus* sugar used as control), impregnating a filter paper. The conditioning phase lasted for 3 hours (flies groomed their wings with their legs and consequently pasted the tastant stimuli on their wings). Then, these flies were immediately transferred in a cage housing a pierced plastic tube containing fresh grape juice, in darkness. The number of flies accumulating inside the tube was measured after 24 hours. Our results are expressed as a ratio between the number of control flies (conditioned by the water *plus* sugar solution) *versus* the number of flies conditioned either with the fresh or with the fermented grape juice ($n = 15$). We controlled for potential toxicity of this experiment by measuring the viability of the flies of each lot spent on regular food tube for 5 days and found no significant effect ($90\% \pm 5\%$ survival, $n=5$).

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Gilbert Engler for assistance in confocal microscopy and fruitful discussions, Angela Algeri, Kristin Scott and Daisuke Yamamoto for comments on the manuscript. H. R. thanks Laury Arthaud and Sophie Tares-Amichot for technical help. This work was supported by the ANRs blanc “Gustaile” and “Exdisum”.

[RESULTATS]

SUPPLEMENTARY DATA

Text S1

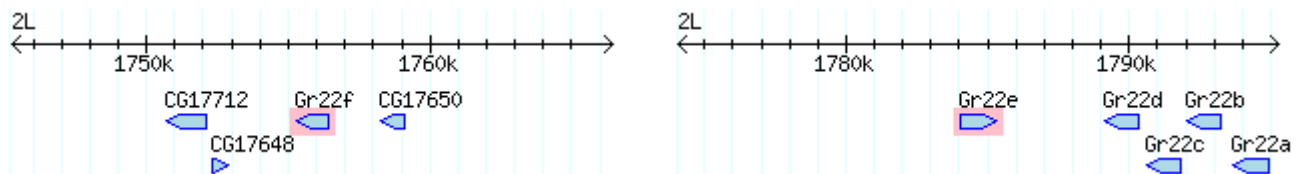
PRIMERS for GRs in *Drosophila melanogaster*

House Keeping Gene ALDH 6: 300 bps

House-Keeping Gene Ribosomal protein S8 (RpS8): 444 bps

```
1  ATGGGTA TTA GCCGCGATAG TGCACACAAA CGCCGGGGCCA CCGGAGGCAA
51  GCGCAAGTCG CTCCGCAAGA AGCGCAAGTT CGAGTTGGGA CGCCCCGCCG Tm = 62 (F)
101 CCAACACCAA GCTTGGCTCC GGCCGCGTGC ACAAGGTGCG CACCCGTGGT
151 GGAAACACCA AGCTCCGTGC TCTGCGCCTG GAAACCGGAA ACTTCGCCTG
201 GGCCTCCGAG GGAGTGGCGC GCAAGACCCG TATCGCCGAT GTTGTGTACA
251 ACGCCTCCAA CAACGAGCTG GTGCGAACCA AGACCTTGGT GAAGAACAGC
301 ATCGTGGTCA TCGATGCCAC GCCCTTCCGC CAGTGGTACG AGGCTCACTA
351 CGTGCTGCCC CTGGGACGCA AGCGTAACCC CAAGCACGCC CAGAAAGAGG
401 ACGAGAACGA CGTGCTGACC AAGAAGCGCA GCGAAAAGGT TATGAAGAAG
451 TACCTGGAGC GCCAGAAGTA CGGCAAGGTC GAGCAGGCCC TCGAGGATCA
501 GTTACCTCC GGCCGCATTCT TGGTTGCAT TTCTTCCCGC CCCGGACAGT Tm = 62 (R)
551 GCGGTCGCTC CGACGGCTAC ATTTTGGAAG GCAAGGAGTT GGAATTCTAC
601 CTTAAGAAGA TCAAGTCTAA GAAATAA
```

DmGr22



DmGr22e : PCR with primer s: 142 bps or 461 bps

```
1  ATGTTCCGGC CTAGTGGAAG TGGCTACCGC CAGAAGTGGA CTGGTCTCAC
51  GTTGAAGGGT GCTCTATACG GATCATGGAT CCTGGGCGTG TTTCCCTTCG
101 CCTACGATAG CTGGACAAGG ACATTGCGTC GTTCCAAGTG GTTAATTGCG
151 TATGGCTTTG TCCTGAATGC CGCATTCAAT CTGCTGGTCG TTACCAATGA
201 CACGGAGAGC GAAACTCCGC TGAGAATGGA GGTGTTCCAC AGGAACGCAC
251 TGGCCGAGCA GATCAATGGC ATTCACGACA TTCAGAGCCT GTCAATGGTG
301 TCAATAATGC TGCTGAGAAG TTTCTGGAAG AGCGGCATA TCGAGAGGAC
```

[RESULTATS]

```

351  ACTCAACGAA CTGGAGGACC TGCAGCATCG CTACTTTCGT AATTATTCTC
401  TGGAGGAGTG CATCAGCTTC GATAGGTTTG TCCTGTACAA AGGCTTCTCT
451  GTGGTCCTGG AACTAGTATC CATGCTGGTG CTGGAAGTGG GCATGTCACC
501  GAACTACAGT GCACAGTTTT TCATTGGACT CGGCAGTTTG TGTTTGATGT
551  TGCTGGCAGT TCTCCTGGGA GCCTCACACT TTCACCTGGC CGTGGTCTTT
601  GTCTACCGAT ATGTGTGGAT TGTAAATAGG GAGCTTCTCA AACTAGTTAA
651  CAAAATGGCG ATTGGGGAAA CTGTTGAGTC TGAGCGGATG GACCTTTTGC Tm = 60
701  TCTATCTGTA CCATCGCCTA TTGGATCTCG GCCAGCGTCT GGCATCCATC
751  TATGATTATC AAATGGTCAT GGTGATGGTC AGCTTTCTTA TCGCCAACGT
801  GCTGGGCATC TACTTCTTCA TAATCTACTC CATTAGCCTA AACAAAAGCC
851  TGGACTTTAA AATCCTGGTC TTCGTTCAAG CGCTGGTCAT TAACATGCTG
901  GATTTTTGGT TGAACGTTGA GATTTGCGAG TTGGCGGAAA GAACTGGGAG
951  ACAAACTTCC ACCATACTTA AGTTGTTCAA TGACATTGAA AACATAGATG
1001 AGAAACTAGA GAGAAGTATC ACGGACTTTG CATTATTCTG CAGCCATCGC Tm = 60 (F)
1051 CGGCTGAGAT TCCACCATTG CGGCTTGTTT TACGTGAAC TACGAGATGGG
1101 TTTTCGCATG GCCATCACCA GCTTCCTGTA CCTGCTGTTT CTCATCCAGT Tm = 60 (R)
1151 TCGATTATTG GAACCTGTGA

```

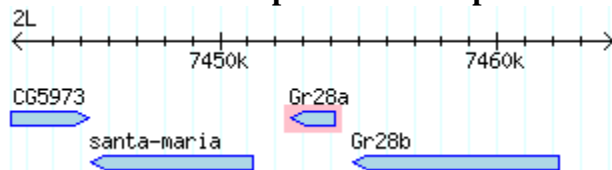
DmGr22f: PCR with primers: 113 bps or 495 bps

```

1  ATGAAAATGT TCCAACCTCG TCGCGGCTTC AGTTGCCATT TGGCATGGTT
51  CATGCTGCAG ACGACCCTCT ACGCATCCTG GCTACTGGGA CTGTTCCCTT
101 TCACCTTCGA TTCCCGGAGA AAGCAGTTGA AACGCTCCCG ATGGCTTCTC Tm = 62 (F)
151 CTCTACGGTT TCGTTCTGCA TTCTCTGGCC ATGTGCCTAG CCATGAGTAG
201 CCACTTGGCA TCCAAGCAGC GAAGGAAATA TAATGCATTT GAGCGCAATC
251 CGCTGTTGGA GAAAATATAT ATGCAATTTT AGGTTACTAC ATTCTTCACT
301 ATAAGCGTAC TACTGCTCAT GAATGTTTGG AAAAGCAACA CGGTTCGGAA
351 AATTGCCAAT GAACTACTCA CCCTTGAGGG CCAGGTAAAA GACCTTCTCA
401 CTCTGAAGAA CTGTCCCAAC TTTAACTGTT TCGTGATTAA AAAACATGTG
451 GCTGCAATAG GTCAGTTCGT GATTTCAATT TACTTCTGCC TATGCCAAGA
501 AAATTCGTAC CCGAAGATCC TTAAGATCCT TTGCTGCCTG CCATCGGTGG
551 GCTTGCAGCT GATTATAATG CACTTTCATA CCGAAATCAT TTTGGTCTAC
601 CGCTATGTGT GGCTGGTCAA TGAAACCCTC GAAGATTAC ACCATCTAAG Tm= 64 (R)
651 CTCCTCAAGA ATTCACGCAC TAGCATCCTT GTACGATCGC CTGCTGAAGC
701 TGAGTGAATT GGTGGTAGCG TGCAACGATT TGCAACTGAT CCTTATGCTA
751 ATTATTTATT TAATCGGAAA CACTGTGCAA ATCTTTTTCC TCATTGTGCT
801 CGGAGTAAGC ATGAATAAGC GGTATATTTA CTTAGTGGCT TCCCCACAAT
851 TGATCATCAA TTTCTGGGAC TTCTGGCTGA ATATCGTGGT GTGTGATCTT
901 GCCGGAAAGT GTGGAGACCA AACATCAAAG GTCCTGAAAC TGTTCACTGA
951 TCTGGAGCAC GACGATGAAG AGTTAGAGAG AAGTTGAAT GAATTCGCAT Tm = 60 (F)
1001 GGCTGTGCAC CCACCGCAAG TTTGCGTTTC AGCTGTGTGG TCTCTTTTCC
1051 ATTAACCACA ACATGGGCTT TCAAATGATC ATCACCAGTT TTCTATACCT Tm = 60 (R)
1101 GGTTTACCTG CTTACAGTTG ACTTCATGAA CTTGTAA

```

DmGr28a : PCR with primers: 250 bps or 806bps



```

1  ATGGCCTTTA AGTTGTGGGA GCGCTTTTCA CAGGCGGACA ATGTGTTCCA
51  GGCACCTCGA CCGCTAACAT TCATATCGCT ATTGGGCCTG GCTCCATTTC

```

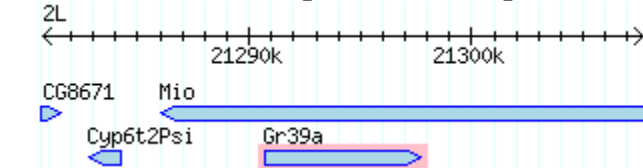
[RESULTATS]

```

101  GTTTGAATTT  GAATCCTCGC  AAGGAGGTGC  AAACATCGAA  GTTCTCCTTC
151  TTTGCCGGCA  TAGTGCACCT  CCTGTTCTTC  GTCCTGTGTT  TTGGTATCTC
201  CGTAAAGGAG  GGAGATTCCA  TAATAGGGTA  CTTCTTTCAG  ACCAATATCA
251  CCAGATTCAG  CGATGGAACC  CTACGCCTGA  CTGGCATCCT  GGCCATGTCC
301  ACTATTTTTG  GCTTTGCCAT  GTTCAAGAGA  CAACGTTTGG  TCAGCATAAT
351  ACAGAACAA  ATAGTGGTGG  ACGAGATATT  TGTGAGGCTG  GGCATGAAGT Tm = 60 (F)
401  TGGACTACCG  CAGGATACTG  TTGTCCAGCT  TTCTCATATC  CTTGGGCATG
451  CTGCTGTTCA  ACGTCATTTA  CTTGTGTGTG  AGCTACAGCC  TGCTGGTCAG
501  TGCCACCATA  TCGCCCTCAT  TTGTGACTTT  CACAACCTTC  GCCCTGCCGC
551  ACATCAATAT  CAGCCTGATG  GTCTTCAAGT  TTCTTTGCAC  CACGGACTTG
601  GCCAGGAGCC  GGTTTAGTAT  GTTAAACGAA ATCCTGCAGG ATATTTTGGG Tm = 62 (R)
651  TGCCCATATA  GAGCAATTAA  GCGCCTTGGA  ACTCTCACC  ATGCACTCGG
701  TTGTCAATCA  CAGACGCTAC  TCACATCGCC  TACGAAATTT  GATTAGTACG
751  CCAATGAAGC  GGTACAGTGT  TACCTCCGTC  ATACGCCTCA  ATCCCGAATA
801  CGCAATCAAA  CAGGTGTCCA  ACATACACAA  TCTGCTCTGC  GACATTTGCC
851  AGACCATCGA  GGAATACTTC  ACATATCCGC  TGCTCGGAAT  CATAGCCATA
901  TCCTTTCTGT  TCATTCTCTT  TGATGACTTT  TACATTTTGG  AAGCCATTCT
951  GAATCCCAAA  CGACTGGATG  TCTTTGAGGC  CGATGAGTTC  TTTGCCTTCT
1001 TCCTGATGCA  GCTCATCTGG  TATATAGTGA  TCATAGTGCT  GATCGTGGAG
1051 GGCAGCAGTC  GGACTATTTT  GCATAGCAGC  TATACGGCAG  CTATAGTTCA
1101 CAAGATTCTC  AATATCACCG  ATGATCCAGA  ACTCAGAGAT  CGACTTTTCC
1151 GTCTGTCTCT  GCAGCTGTCT  CATCGGAAGG  TCCTTTTCAC AGCCGCAGGA Tm = 60 (R)
1201 CTTTTTCGTC  TGGATCGCAC  ACTGATTTT  ACGATTACTG  GTGCTGCCAC
1251 GTGCTACCTC  ATTATCCTAA  TTCAGTTTCG  ATTACACAT  CACATGGACG
1301 ACACCAGCTC  CAATTCAACA  AATAATTTAC  ATTCCATTCA  TCTCGGCGAT
1351 TGA

```

DmGR39a : PCR with primers: 137 bps (as four Gr39a subtypes)



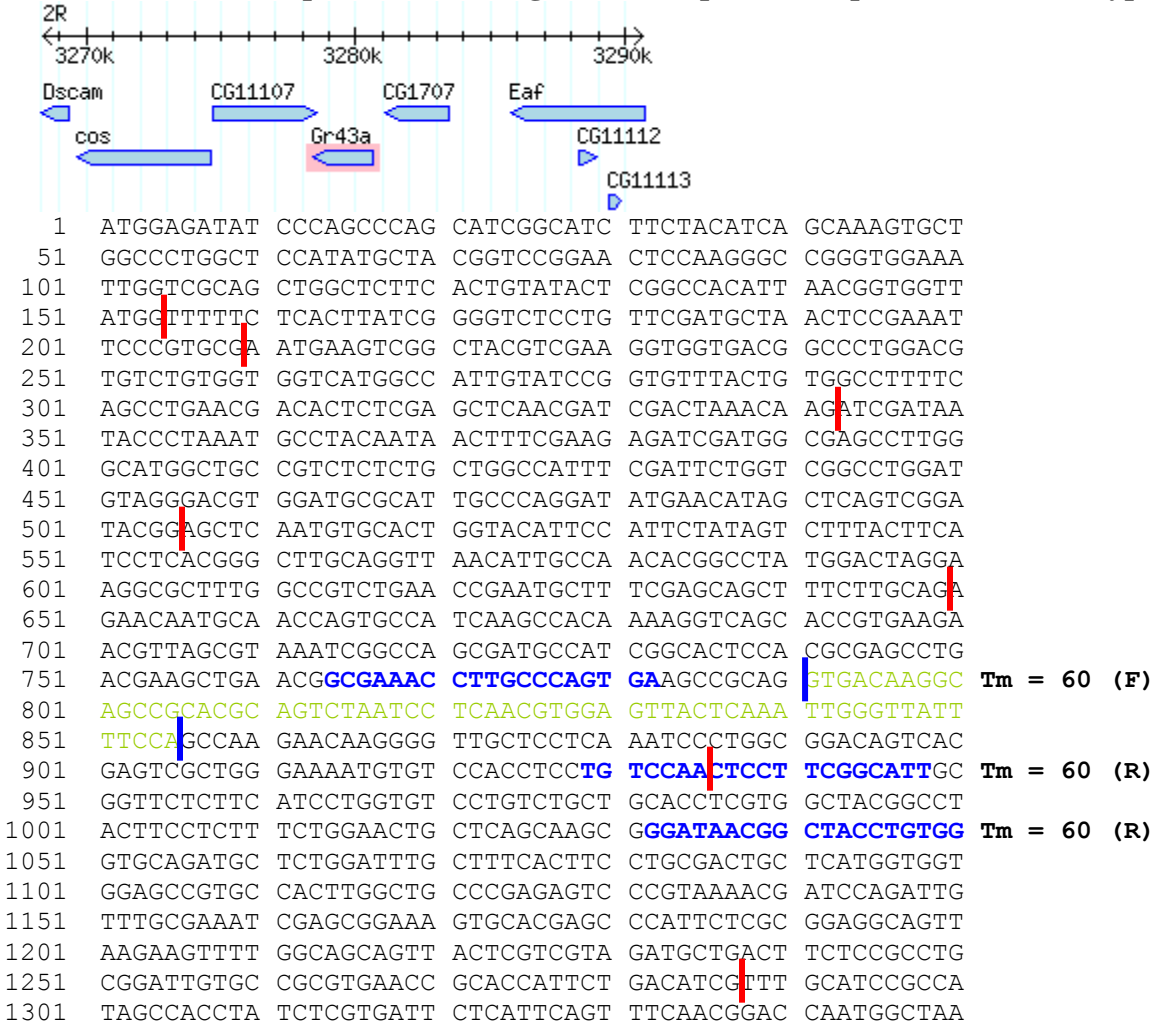
```

1  ATGAAACGCA  ACGCATTGTA  AGAGTTGAGG  GTTCAGTTGC  GAACCTTAAA
51  ATGGCTTGGA  GTCCTGCGGT  TCACTATCGA  CTTTAATAAG  TGCTTAGTAC
101 GGGAAAATGC  GTCTGAGGAG  CGCAGTGCCT  GGCTGTATTT  GATAGGTGTA
151 GTGGGAATTA  CGTGCAGCTT  GATCGTCTAC  AGCACTTACT  TTCCAGTCA
201 CTTTATTATG  GGAAACACA  ACACCACGGG  CAATTGCTAT  GCCCTAATCA
251 ACATCAGGTC  CTGTTCCATT  GTAACAATGC  TGATTTACAC  ACAGCTCTAC
301 ATACAACGTT  TTCGATTCTG  CGCCCTCTTA  CAGTCCATTC  TACGTTTTAA
351 CCAGATCTCT  GGGAGTCACA  GAGAAGAAGG  AAGATTTGCT  TTTTATTATT
401 ATACACATTT  ATCCCTACTA  ATCATTGTGA  TGCTGAACTA  TGCTTATGGT
451 TACTGGACAG  CAGGTGTTCT  CTTGACCACA  ATTCCTATTT  ATCTGCTTCA
501 ATACGGATTT  TCATACCTCT  TCCTCGGACA  GGTGGTGGTC  CTGTTTGCCT
551 GCATTCAACA  AATATTACTT  TCGATTTTAA  AGTACTATAA  CCAAGTAGTT
601 CTTAAAAATA  TTAAATCAAG  CAAGGAGAGT  CGCGAATTCT  ATTACAACCT
651 TTGCAAATAC  AACCAAGTAA  TATGGCTAAG  CTATACCGAG  ATCAACCATT
701 GTTTCGGTTT  GCTACTATTA  CTCGTAACCG  GATTAATTCT  GCTAATCACC
751 CTTTCTGGGC  CGTTCTATTT  GGTATCTACC  ATATTTGAAG  GACGATTTCT
801 TCAGAATTGG  CAGTTCAGCT  TAATGTCGTT  CACTGCCATA  CTTTGGAGCT
851 TACCATGGAT  AGTTTTGCTG  GTTTTGGCAA  TGGGCAGGAA  TGATGTACAG
901 AAGGAGCAA  ATAAAACAGC AAAGATGCTG ACAAAGTAC  CCCGAACCGG Tm = 66 (F)
951 GACTGGGTTG  GATAGAATGA  TTGAAAATTT  CTTACTCAAG  AACCTTCGAC
1001 AGAAGCCCAT  TTTAACCAGT TATGGATTTT TCGCTCTGGA TAAAGTACT Tm = 66 (R)
1051 TTGTTTAAGC  TATTTACTGC  AATCTTCACG  TATATGGTTA  TTCTGGTCCA
1101 ATTCAAGGAG  ATGGAAAATT  CCACAAAGTC  TATTAATAAA  TTTTGA

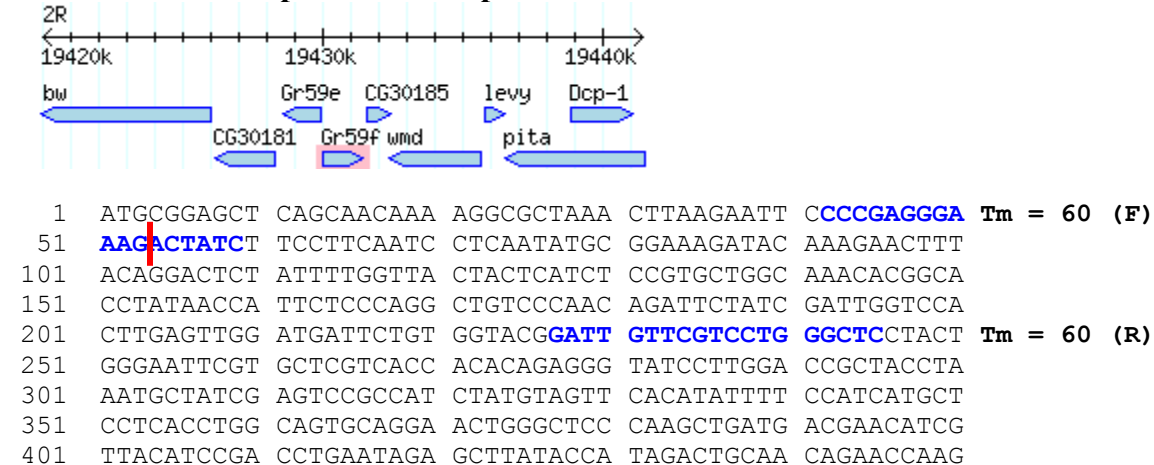
```

[RESULTATS]

DmGr43a : PCR with primers: two fragments 119bps or 185 bps (due to two subtypes)



DmGr59f: PCR with primers: 204 bps



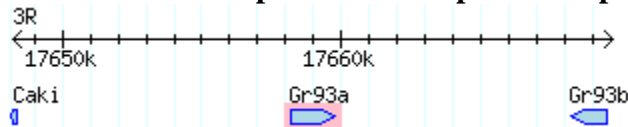
[RESULTATS]

```

451 AGATTTATTA GGCTCCAGCT GTTCTGGTG GGAATTTTGG CCTGTCTAGC
501 GATCTTCTTC AACATCTGGA CCCACAAATT CGTTGTATAT AGATCGATCC
551 TGAGCATCAA CAGCTACGTG ATGCCCAATA TCATAAGTAG CATATCCTTC
601 GCCCAGTACT ACCTGCTGCT TCAAGGAATC GCTTGGCGTC AAAGGAGGCT
651 AACTGAAGGC CTGGAGCGGG AACTAACTCA TTTGCACAGT CCCCGAATAT
701 CAGAGGTCCA GAAAATCCGA ATGCATCACG CGAATCTAAT TGATTTTACC
751 AAGGCGGTGA ACCGGACGTT TCAGTACTCC ATCCTACTGC TCTTCGTGGG
801 ATGTTTCCTG AACTTCAACC TCGTCCTGTT CCTCGTCTAT CAGGGCATTG
851 AGAATCCTTC CATGGCCGAC TTCACCAAGT GGGTATGCAT GCTTCTCTGG
901 CTGGCCATGC ACGTGGGAAA GGTGTGCAGC ATCCTGCATT TCAACCAGAG
951 TATCCAAAAT GAGCATTCCA CGTGCTTGAC CTTATTGAGT AGAGTGTCGT
1001 ATGCCAGAAA AGATATTGAG GATACCATAA CCCATTTTCAT CATCCAAATG
1051 CGGACGAATG TCGGGCAGCA TGTCGTGTGT GGAGTCATAA ATCTGGACCT
1101 CAAATTCTTA ACCACTTTGT TGGTGGCCTC TGCTGATTTT TTCATCTTCC
1151 TGCTGCAATA CGATGTCACC TACGAAGCGT TGTCCAAGTC GGTTTCAGGGC
1201 AATGTCACATA GATATAAGTA G

```

DmGr93a: PCR with primers: 164 bps or 463bps



```

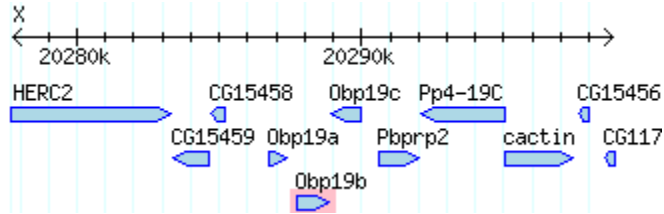
1 ATGTTCAAGT CCAGCTCGGC TATGACCGGG AAACGAGCGG AGAGCTGGTC
51 GCGATTGTTG CTCTTGTTGG TATATCGTTG TGCCCGTGGT CTTCTGGTGC
101 TCTCCTCCAG CTTGGACAGG GATAAGCTGC AGCTGAAGGC GACCAAACAG
151 GGCAGCAGAA ATCGCTTCCT GCACATCCTG TGGCGCTGCA TTGTGGTTAT
201 GATATACGCC GGATTATGGC CAATGTTGAC CTCAGCCGTA ATAGGCAAAC
251 GATTGGAGAG CTATGCTGAT GTCCTTGCTT TGGCCCAGTC CATGTCGGTG
301 TCCATTTTGG CAGTCATATC GTTTGTGATC CAGGCAAGGG GCGAGAACCA
351 ATTCGAGAGG GTGTTGAATA GATATTTAGC GCTTTACCAA AGGATATGCT
401 TGACTACGCG TCTGCGGCAC CTGTTCCCAA CGAAATTTGT GGTTTTCTTT
451 TTGCTAAAGT TGTTCTTCAC TTTGTGCGGT TGTTTCCACG AAATAATACC
501 TCTTTTTGAA AACTCACACT TCGATGATAT CAGTCAAATG GTGGGCACTG
551 GCTTTGGCAT CTACATGTGG CTTGGTACGC TCTGTGTCCT CGATGCCTGC
601 TTCCTGGGAT TTTTGGTATC CGGAATACTG TACGAACATA TGGCCAACAA
651 TATCATTGCC ATGCTGAAGC GAATGGAACC CATAGAGTCG CAGGACGAAA
701 GATATCGTAT GACTAAGTAT CGTAGAATGC AACTCCTGTG CGATTTTGCC
751 GATGAGTTGG ACGAGTGTGC CGCTATCTAC AGCGAACTCT ACCACGTCAC Tm = 64 (F)
801 AAACTCATTG CGTCGAATTC TACAATGGCA GATCCTCTTC TATATCTACC
851 TAAACTTTAT AAATATTTGC CTAATGCTAT ATCAATATAT TCTGCATTTT
901 CTGAACGACG ACGAAGTGGT CTTTGTGTCC ATTGTGATGG CTTTTGTTAA
951 GTTGGCTAAT CTAGTATTGC TCATGATGTG TGCGGATTAT ACGGTGAGGC
1001 AGTCAGAAGT GCCAAAGAAA TTGCCTTTGG ATATCGTTTG CAGCGATATG
1051 GATGGCGAT GGGATAAGAG TGTTGAACA TTTCTCGGTC AGCTGCAAAC Tm = 62 (F)
1101 CCAACGACTG GAGATCAAAG TATTGGGATT TTTCCATCTA AATAATGAGT
1151 TCATTCTTCT CATTCTGTCT GCCATAATAT CGTACCTGTT TATCCTTATT Tm = 64 (R)
1201 CAGTTCGGCA TTACAGGTGG CTTTGAGGCG TCCGAGGACA TTAAAAATCG
1251 TTTTGATTAA

```

[RESULTATS]

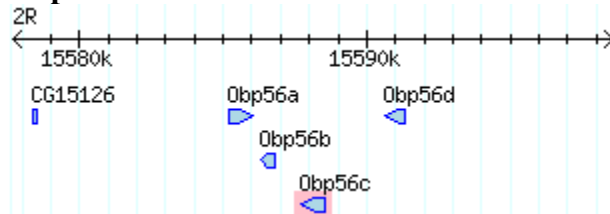
PRIMERS for Obps in *Drosophila melanogaster*

DmObp19b: PCR with primers: 208 bps or 273 bps



1	ATGATGCAGT	GCAGCCGAAT	GACGACGACG	TTGAAGATGA	CGAACCTTCT	
51	GCTAGCAGTG	GCCTGCGCCG	CCGTGCTGAT	GGGATCGGCG	ACGGCGGACG	
101	AGGAGGAGGG	GTCCATGACC	GTGGACGAGG	TGGTGGAGCT	GATCGAGCCC	
151	TTTGGCGACG	CCTGCACGCC	AAAGCCGTCG	AGGGAGAACA	TCGTCGAGAT	
201	GGTGCTGAAC	AAGG AGGACG	CCAAGCACGA	GACCAAGTGC	TTCCGCCACT	Tm = 62 (F1)
251	GCATGCTGGA	GCAGTTCGAG	CTGATGCCCC	AGGATCAGTT	GCAGTATAAC	
301	GAGGACAAGA	CGGTCGATAT	GATCAACATG	ATGTTCCCGG	ATCGCGAGGA	
351	CGACGGCAGG	CGCATCGTCA	AGACCTGCAA	CGAGGAGCTA	AAGGCCGAGC	
401	AGG ACAAGTG	CGAGGCAGCC	CACGGGATCG	CTATGTGCAT	GCTGCGCGAG	Tm = 62 (Q-PCR)
R)						
451	ATGCGCTCTT	CGGGCTT CAA	GATTCCCGAG	ATCAAGGAAT	GA	Tm = 62 (NR)

DmObp56:



DmOBP56c: PCR with primers: 285 bps or 311 bps

1	ATGTATTTTC	GAGCCAGTTT	GATGG CATTG	CTTTGCCCTCA	CTCTTAGTGA	Tm = 58 (F)
51	ATTTCGTTTCT	AAAGCATGGA	CCCGATCGCT	TTCCGTCTCG	CTGAACATGT	
101	CGATGACACG	AACCCTGGTT	CCAGATCCGC	CAAATGGAAC	AGAAAACAAA	
151	CTCAGCCAGG	AGATGCTGAG	GGCTTGATG	CGTAGGACCG	AGATCTCAAT	
201	GTCGCAACTG	AAACTCTTTC	ACATGAGCCT	GATGAACAGC	GACTACAATA	
251	ATGACAACGA	TATAGCCCTT	ACGCCAGTTC	AATCCATTGG	CGATTGCTTT	Tm = 60 (R)
301	GTGAGCTGTC	TGTAT GAGAC	CCTGGATTTC	GATAGGTACA	ATGTCCTGCT	Tm = 60 (R)
351	GGAGGAGGCC	TTTAAGAATC	AGGTGCAAAC	GATCATAACG	CATGAGAAGG	
401	CGGAGATCAA	GGAGTGATG	GATCTTCAGG	GCAAAACACG	ATGCGAGGCA	
451	GCCTACAAGC	TGCACCTGTG	CTACAATCAC	CTGAAAACCTC	TGGAGGCGGA	
501	GCAGCGTATC	CGTGAGATAC	TTGAGCGGAC	CGAGGCGGAG	AACGAGGGAT	
551	TCGGTCCGGA	GGGCAGCGAC	TTTATCGACG	GCATCCAGCA	TTCCGGAGAA	
601	GCAATGACCA	CCGCTAAGTC	GGAGTAA			

DmObp56d: PCR with primers: 219 bps or 240 bps

1	ATGAAGTTCC	TG ATTGTCCT	CTCCGTCATT	TTGGCCATT	CGGCTGCTGA	Tm = 60 (F)
51	GCTGCAACTA	TCCGATGAGC	AGAAGGCTGT	GGCCCATGCC	AATGGCGCCC	Tm = 60 (F)

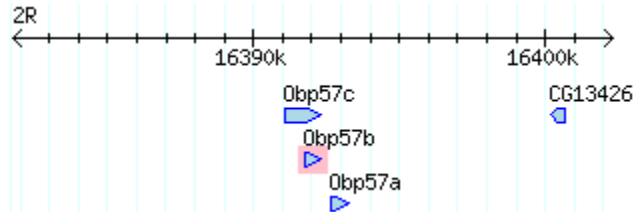
[RESULTATS]

```

101  TTTGTGCCCA GCAGGAGGGA ATCACCAAGG ATCAGGCGAT CGCCTTGCGA
151  AACGGCAATT TCGATGACAG TGACCCCAAG GTGAAATGCT TCGCCAATTG
201  TTTCTTGAG AAAATCGGAT TCCTGATCAA TGGTGAGGTC CAGCCCGATG Tm = 60 (R)
251  TCGTTTCTGGC CAAGTTGGGA CCCCTGGCCG GCGAGGATGC CGTGAAGGCC
301  GTTCAGGCCA AGTGTGATGC CACCAAGGGA GCGGATAAGT GCGATACTGC
351  CTATCAGCTA TTCGAGTGCT ACTACAAGAA TCGCGCCAC ATCTAA

```

DmObp57b : With primers 335 bps



```

1  ATGTTTCATCT ACAGACTTGT ATTTATTGCG CCTCTGATTT TGTTATTGTT Tm = 60 (F)
51  CAGCTTGGCC AAGGTCGCC ACCCCTTTGA TATATTTTCAT TGGAATTGGC
101 AAGACTTTCA GGAGTGTCTA CAAGTTAATA ATATTACCAT AGGAGAATAT
151 GAGAAATACG CGCGACACGA AACTTTGGAT TACCTGCTCA ACGAGAAAGT
201 CGACTTGAGG TACAAGTGCA ATATTAAATG TCAGCTGGAA AGGGATTCAA
251 CGAAATGGTT GAATGCTCAA GGCAGAATGG ATTTGGATTT GATGAATACG
301 ACCGATAAGG CATCCAAATC CATTACCAAG TGCATGGAGA AGGCTCCCGA Tm = 60 (R)
351 AGAACTTTGT GCGTACAGTT TTAGACTGGT GATGTGTGCA TTTAAGGCTG
401 GCCATCCCGT AATTGATTCT GAATAA

```

PRIMERS for GRs of *Acyrtosiphon pisum*

House-Keeping Gene Ribosomal protein Light 7 (RPL7): 129bps

ApRPL7-F ACTGTTTCAGATTGCGTCAGATC

ApRPL7-R AGTTCCCTTACGCTCTTCAAGT

Place for introns in the genomic sequence: |

The unreported genes gave a weak or inexistent signal in PCR with poly A RNA extract from total aphid and the analysis in wing was therefore not pursued.

ApGr1: PCR with primers: 351 bps (Sugar receptor)

```

1  ATGTTCAACG ACGATAATAA TAATACCGGG CCGGTGTATC TGAAGCATCG
51  GAATTTTCGCC GAGTCCGCGT ACAGACAGCA GCAGCCTCAA CCGATAAGTG
101 CCGTGCAGTT TGCAGATTCT GCGTTCAATT CGAAAGCCAA CAAAGGGAAT Tm = 64 (F)
151 AATATCAAAC TTGAAATACA AGACGATCTT GGCATGCCGG TAAACTACGT
201 AAGAATTAAA GCCTTGGAAG ACGATATACG GATGAATATA ATTAGCGACA
251 AAAATTCACT TCACAGAGCC ATCACTCCAG TACTAATTCT TGCACAAATG
301 TGCGTCTTTT TACCAGTTCA AGGTATTCTGA GGGAAAAACA CTAGTTATTT
351 AGTATTCAAT TGGTACAGTT GGCCAGTTAT TTATGTCTTC ATTGTAATTG
401 CTGCGTCCCT CCTAATTCTT TCATTTTCAC TCATCAAAAT ATATATGACT
451 GGACTGACGT ATTACAGCAC GGGAGAAATA ATGTTTTTCG GAAGTTCACT Tm = 64 (R)

```

[RESULTATS]

```

501  GGTAATTTAC ATTCTATTTA TTCATTTGGC AAGGGAATGG CAAAAGTTA
551  TGGAAAAATG GGAACAAATG GAACGTGAAA TGAGACAATT TGGTTACCCT
601  TCCAAAACGG CTTTTAAATT CAAGATCCTT ACAAGTATCA TAATGGTGCT
651  TGCTATAATT GAACATTCTG CTTCCGTTTT AACTGGAATA ATGAAAGCAA
701  TTCCTTGTTT GACGGGTGGA CTTGATATCT TTCGAGCTTA CTTCTCCATG
751  TCTTTTCGAC AAGTCTTTGC ATTGATTGAT TATTCACCTG TGATCGCTAT
801  ACCTTTGGGA TTTTAAATC TTATGCTTGC TTGTGCTTGG AATTATATGG
851  ATTTATTTAT AATCATACTA GCATGTGCGT TGTCTGATAA ATTTAAGCAG
901  CTCAATCAAA AACTAGCCAG TATCAAAGGA AAGGTGCTTC CAAGTACGTA
951  TTGGCGGAAA TCCAGAGAAA CATATAACCT ATTAGCGTCG TTAAGTCAAG
1001 ACTTTGATGA GTTTTTGTCA CCGGTGATAC TATTATCATT TGCTAACAAAT
1051 TTGTACTTTA TTTGCTTACA GCTTCTAAAC AGTTTGAAAC CAATGCACAA
1101 GGTTTGGGAG GCCATTTACT TCGTGTTTTT ATTTACATAT TTAGTTGGAA
1151 GAACATGCTG AGTATCTTTA TATGCTGCTT CCATAAACGA TCAAAGCAAA
1201 AAACCAAAAG CAATCTTGTT TTCTGTGCCG ACCGAAAGTT ATGGAGTGGA
1251 GGTAGCAAGA TTTTAAACAC AAGTAACATC TGATGAATTG GCATTGACCG
1301 GATGCAATTT TTTTTCGGTG ACTAGAACAT TAATGTTGAC GGTTGCTGGA
1351 ACAATTGTCA CATACGAGAT CGTATTGATA CAATTCAACA GTGTAAATAG
1401 TGACGGAAAT GGTCAAAATC ACACAATTGT TTAGTGCCA TAA

```

ApGr2: PCR with primers: 477 bps (Sugar receptor)

```

1  ATGCCTAACG AAAACACTTT CCAGCCTGTT TATCTCAAGG AAAGGAATTT
51  CTCTGAAGCT GGATATGATC GGCAGTCGAA ACAAAGTTCA TTAACCGATT
101 CGGCGGTCCG TTCGAATTAC AATGCACTGA GCTTAAAGA AAACAAGGGG
151 AGTATTGAC TTGAAATACA AGACGATCTT GGTATGCCAG TAAACTATGT
201 GAGAATCAAA GTCTTGGAAG ACAGTGTAAG GAAGAACATA ATTAGCAATA
251 AAAATTCATT GCACAGAGCC ATCACTCCTT TACTTATTTT GATGCAAATG
301 TCCGGTCTTT TACCAGTTCA AGGCATTAGA GGACAAAACA CTAGTTATTT
351 AATTTTCAAT TGGATCAGCT GGATAATGGC ATACGACATT ATTGTAGTTG
401 GCTCTTCTAT TGTAATGGTT TCGTTTATAA TATGCAACAT GTATATTAAT
451 GGACTGTCGT ATGAGGGCAT TGGTGATTTA GTATTTTATG GAGGTACACT Tm = 60 (F)
501 AATCAATTAC ATGGTTTTTA TCCATTTGGC AAGGGAATGG CAAAAGTTA
551 TGGAAAAATG GGAACAAATG GAACGTGAGA TGAAACAGTA TGGATACCCA
601 CCCAACATGG CATTTAAGAT TAAATGTGA ACATGTATCA TCGTGTTATT
651 TTCAATAATT GAACACTTGG CTTCTATTTT AACGGGAGTA TTGAAAGCTA
701 TAGATTGCTC AAAGGATGGA CTAGATATTT TTCGACTTTA CTTTATGACA
751 TGGCTTAAAT CAGTCTTTAC GATTATAGAC TACTCGTTTC TAGTAGCTAT
801 AATTTTGAAG TTTTGTGATT GTTTGTATTC TTTTGCTTGG AATTTTATGG
851 ATTTATTTAT AATCATACTA GCCTGTGTTT TGACGGAAAA ATTCAAGCAG
901 TTTAACCAAA AATTTGACAG CGTCAGAGGA AAAGTGCTTC CAAGTATGTA Tm = 60 (R)
951 TTGGCGGAAG TCTAGAGAAA CGTATAATAT TTTAGCGTCG TTAAGTGAAG
1001 ACTTAGATGA ATTTCTATCT CCAGTGATAT TATTATCATT TGGTCATAAT
1051 TTGTACTTTA TTTGCTTACA ACTTCTTAAC AGCTTGAAAC CTATGCACAG
1101 CTCTTGGGAG GTTCTATGTT TCGTAATTTT ATTTACATAC CTAGTTGGAA
1151 GAACATGCGT AGTGTCTTTG TATGTCGCAT CCATTAATGA TCAAAGCAAA
1201 AAACCAAAAG CTGTCTTGTT TTCTGTGCCA GCGGAGTGTT ATGGAGTCGA
1251 GATAAAAAGA TTTTAAATGC AAGTGACGTC TGATGAATTA TCATTTACGG
1301 GATGTAATTT TTTTACCGTC ACTAGGACGT TTATGCTAAC GGTTGCCGGA
1351 ACTATAGTCA CGTACGAGAT CGTATTAATA CAATTGAACA ATGTGGCTAG
1401 CGGAGTACCT GACCAAAATA ATACTATTAA TAATTATTGT TCAAAGCTAT
1451 CATGA

```

ApGr3: PCR with primers: 386 bps (Sugar receptor)

```

1  ATGTCTGACG AAAACACTTT CCAACCCGTT TATCTCAAGG ATAGGAATTT
51  CACTGAATCT GGATATGAAC GGCAGTTGAA ACAAAGTTCA TTAGCCAATG
101 TGGCGGTCCG TTCGAATTAC AACGCACTGA GCTTAAAGA AAACAAGGGA

```

[RESULTATS]

```

151  AATATCGCAC TTGAAATACA AGACGATCTC GGTATGCCAG TAAACTACGT
201  GAGAATCAAA GCCTTGGAAG ACAGTATTAG GAAGGATATA ATCAGCGATA
251  AAAATTCGTT GCACAGAGCC ATCACGCCCT TACTTATTTT GGTGCAAATA
301  TCGCTCTTTT TACCGGTGCA AGGCATTAGA GGACAAAACA CTAGTTATTT
351  AGT|TTTCAAT TGGTTCAGCT GGATAATGTC ATACAGCATT AT|TTTAGTTT Tm = 60 (F)
401  GCTCTTCTCT GTTGATGATT TTGTTAATAG TATTCAACTT GTATAGGAAT
451  GGACTGACAT ATGAAATCAC TGGT|GATTTA GTATTTTATG GAGGTACACT
501  AATCAATTAC ATGGTTTTTTA TCCATTTGGC AAGGGAATGG CCAAAAGTTA
551  TGGAAAAATG GGAACATAATG GAACGTGAGA TGAAACAGTA TGGATACCCA
601  CCCAACATGG CATTTAAGAT TAAAATGTTA ACATGCATCA TCATGTTACT
651  TTCAATAA|TT GAACACTTGG CTTCTATTTT AACGGGAGTA TTGAAAGCTA
701  TACATTGCTC ACCGGATGGA CTAGACATTT TTCGACTTTA CATTTTGACT
751  TCGCT|CGAA CCGTTTTTAC GTTTATAGAC TACTCGTTCG TAGTAGCTAT Tm = 62 (R)
801  AATTTTGAAG TTTTTTAATT GTTTGTATTC TTTTGCTTGG AATTTTATGG
851  ACTTATTAAG AATCGTACTA GCCTGTGCTT TGACGGACAA ATTCAAGCAG
901  CTCAACCAAA AATTAGATAG CGTAAGAGGA AAAGT|GCTCC CAAGTATGTA
951  TTGGCGGAAA TCTAGGGAAA CATATAATGT TTTAGCGTCG TTAAGTCACG
1001  ATTTTGATGA ATTTCTATCT CCATTGATAT TATTATCATT TGGTCATAAT
1051  TTGTACTTCA TTTGCTTACA GCTTCTCAAC AGCTTGAA|AC CTATGCACAG
1101  CTCTTGGGAG GCTCTATGTT TCGCATTTTT ATTTACATAC CTAGTTGGAA
1151  GAACATGCGT GGTGTCTTTG TATGTCGCAT CCATTAATGA TCAAAGCAAA
1201  AAACCAAAAA CTGTCTTATT CTCTGTGCCA GCAGAGTGCT ATGGAGTCGA
1251  GGT|AGAAAGA TTTTAAATGC AAGTGACGGC TGATGAATTA TCATTTACTG
1301  GATGTAATTT TTTCTCCGTC ACAAGGACGT TTATGCTAAC GGTTG|CTGGA
1351  ACTATAGTCA CATACGAGAT AGTATTAATA CAATTTAACA ATGTGGCTAG
1401  CGAAATACCT GATCAAAATA ATACTTTTGC TAATTATTGT CCAAAGTTAT
1451  TATGA

```

ApGr6: PCR with primers: 241 bps

```

1  ATGTTGAAAA ACGTCATCAA AGTGAAACTG ACAAATAATT TCAAACGATT
51  CAAAATAAAT CCCACAAGA CGGTCGACAT CGAGTCGAGC TCCTGTTACT
101  TCCTTGACGT GCCCAAAATC CCGTCCGACT CGTTCCGATC TGCCACAAAT
151  TTCCCAGCGA TACTCGGCCA ATATCTGTGC CTGATACCGA TATCGCAGGA
201  TCGTTTCCGG ATATACAGCT TGAGGACCGC TCTGTCGGTG GTCGCGCTTG
251  TCTGTCAAAT CATCATGACG TTTTGTAGTT TTTGCTGGCT GAAGGAAACA
301  GGCGCCAA|CA TATTCAAAGG AGGT|TAGTTT TTGTTCTTTG GTGGGTCAGC Tm = 60 (F)
351  CGTCACCATG GCGTTGCTCA TTAAGTTGTC GACCAACTGG TGCAATCTAC
401  TAGACAAATG GGAACAAGTG GAGGGGTACT TCGGCCACCA AAAGAATTTG
451  AGGTTGAAAT TCACTCTCAT ATCCATTTTG TGTATTATTT TTTCGATGGT
501  GGAACATTTG AGCTACTTGT TGACAGGCAT |CATAACGACG GAACGGGAGA Tm = 60 (R)
551  ATTCTCACGA AGTATTCGAA ATTTACGTCT TGAAAATGTT CCCACAAGTA
601  TTTACTGTGA TTACATACAA CACGTGGATA GCAGTGTTGG TGTTAGTAAT
651  CAATTCCGTG TCGACTCTCA CCCTTTGTTT CTCGGATCAG ATCATCATCA
701  TGGGCAGTTT AGCGCTGGGA AATTACTTTC AGATATTCAA TGACCGCATG
751  AAAACACACA CAGGCAAGGT ACATCGTATA |GACATTGACG TCGGATCAAT
801  GGAAGACATT GAGAGTGGAC TACACGCGGC TGTGCAATTT GACCAGACTG
851  TTGAACGACT GCTTGTGTCA TTTGCTGTGC GTGTCTTTGA TAATACATCT
901  GTACATCATA TGCGTAGAAC TGCACCAGGG CGTCGTGTAA GGATGTTTTT
951  TTTATGTATA GT|ACGTTCAA ATGAAAATTA CAGTTTAAGT CACCACGTTT
1001  ATGCCATACT TTCGTTTTTTG GTTTCTTCAT TGAGAGGATG TTTATTATGT
1051  TTATGCTCCG TAAAAATATA CGAGAGCAGC AAATTGCCAA AAAGATCGCT
1101  TTATGATATA CCACAGCAAT CATTTTGTAA CGAGGCGAGT TCAGTTTATA
1151  ATGGATCTTT AGTTGT|GGAA TTTTTTTTGT TACAAATACA AAAAGATCAT
1201  ATTGACTTAA CCGGGAGCCA CATGTTTTTA ATGACCAGAA GGTTCTTATT
1251  AACT|ATGTTT GGCACAATTG TTTTCGTATG AATATTATTG GTACAAATGA
1301  AAGGATACAG TTCTCGAAAA AACACTTAA

```

[RESULTATS]

ApGr15: PCR with primers: 314 bps

```

1   ATGAACTTGC GGCCGTTCAA ATGGAGTCCT CTGGCCATGA TAGCGCCTGT
51  TTACTATGCT TGTAATTGT TCGGAATTTT ACCGGTCAGT TACGCCAACT
101 GTGGAAAAAT TCCTTACAGA AATACAATAC ACTTCATTGG GAGGAGACAC
151 GAGAACGGTG AGATTATAAA AACGACCGAA TCATCGTACC AGAACAACGA
201 TGGTGTTTTT ACTTTTTTAA AATTAATATA CATCTATACT CTGTTCAGCG
251 AGAAACCTCC GGTTCTACGC ATCCCCCGCG TTATGCTTGT GCTTTATGAA
301 ATCGATTACC TCTATTCGTT GTACAGTCCT AATTCAAAT CACTCCGCGA
351 CGGATGTTTT CACGTGAGCA ACAGCGGCCT GGTACTGTGG GCCACCCAAT
401 TGGCACTGCA GACATGGGCG TTCATCCGGA TGTGCTTCTA CTTGGGCCAC
451 ACGCTCATGC AGCGCAAGTC GCTCAACTGC TCCC GG GACA ACTACTGTAG
501 CGTTTTCGGT ATGTTGCTGT CGCACACGGT CATCAGCCCG ATCGTCGTGT
551 CCCTGGTGCT GATCCGGTTG CCCC GG TCCG TCGACGTGCT GAACATGACC
601 GCCCGGCTGC TGCTCCGGTC CAGGTACCCA CGTCGCCGAT TGTCTCCCAA
651 CGCGTACGTG GTTGTCTTGT TCTCGGCCGC TATCGTCTTC AAGTTGGTCA
701 CCACCGTCAT GAGCATACCG CAACAGTACC CCGACCTCTA TTACCCGTAC
751 TTCACCGCGT ACATGGTGCC CATCGTGTTT ATAAACCTGG TCAGCATCCT
801 GTGCGTGGTC GCCCAACAGT CGTACGAGGA CATCAACAGA GAGTTAGAAG
851 AGCTATGCGA AGTGAGTTCA AAAACCGAAC GAGCGGTGCG GTTAAACGCG
901 CTAATGAACG ACCACTGGTT TGTGGAGGAC TACATGGAGA CCATGTCAGA
951 CACCTTTGGA CCTGAATTGA TATTCACAAT AATGGATATT TATGTGCAAC
1001 TGTTGTTGTT CATGTACGTA ATGATATGGG ATACGGTTGT CCGTCGCGTG Tm = 60 (F)
1051 TTCAAGGACA ACGCGTATCC GTATATCAGT GGCATCATCG AGTCAAGCAT
1101 TATAATAGGA AAATTCGTTT ACCTATGCTA TAGGTGTGAC TCTTCCATCA
1151 AAGAGCTAAG GTTATTTACG CTTGCGGTTA ACAGTCGTGC AGTACAAGTT
1201 ACAGCTTCCG GATTTTTTCGA CATAAATCTA TCACTTTTGT TTGCGACTGC
1251 TGGCGTTGTG TTGATTTACT TTTTGGTGTT GGTGCAATTT CAAATGGAGG
1301 GCTACAAACA TATTTTAGGA TCAAATCTA GTGATGCGGT TGTAGCGGT Tm = 62 (R)
1351 GTCTGTCATT CATGGCCTTG TCTTGAGAGG GATGACCAAG ATTAA

```

ApGr16: PCR with primers: 551 bps (expansion 21 ApGr)

```

1   ATGTGGCTGA TCCGGGCGTT TTGGAGACTG TGCGGAGTGT TCACCATCGA
51  CCTGTCGTAC AACAAAGTTT AAAACGCGTA CTCCGCGCTG CTCATAGCTT
101 CGTGCGTTTA CAATTTTCGTG AACGCGTCGC AGGTCATATG CAAAGTGGAC
151 CACTGGTGCT CCACGTTTTT GTCGACGCTG ACGGCCGTTT ACGACAGGGT
201 GTTGACGTCC GCCGTGTTCT TATCCCGGAT CGCGGTCGTG TACGCATGCA
251 AGCCGAACAT GTCCAGGTAC CGAGCGACCA TCAGAGCGTT CGAGGCGTAC
301 TCGCCGCCGT CGCCCACGGA GCTCCGGCGG CACAGGGCGT TTTGCTGGC
351 CGTGGTCGCC GCGTGTCTGG CCGTCATCGT GCCCACC AAC TCGATCTGCA
401 TGTACTACTT GTGCCGGTAC GAGCCCAATT CGGATGCGTC GCTGTTGCTC
451 TACCAGCTGT TCATGTACGT CCAGAACCTG AGCATGTGCT GCATCGAGAC
501 GCAGTTTGTC GTGCAGTGTT TCAAGGTCTA CACCAAGTTT CACGGCATCA
551 ACGGCGATCT GAAGAGGCTG AAGGACGAAA ACCTCAACCG CTCCGAATAC Tm = 60 (F)
601 CCGTTTATGT CGTCCGCGGG CTCGCCGCCG CCGCCGACGT CGCGGGCTGC
651 CGTCGTGTAC GACAAAGACT TTTACCGTCC ACGGTTTCATG AGCCACCCGA
701 CGGCCAACAC GGTTGAGTTG CTCAGAATTA AACACTGGCT GATCCGACTG
751 TCGATAGACG CGCTCAACAA CCTGTTTCGGC GTGCACATGG GACTGTGCGT
801 GTTCTACTTG TGGCTCATGG CTTGTTTCGA TATTTATTAC GAAATGTTCC
851 ACAAATCTCG GTCGGGACTG TTGGTCTACT GTTGGCTGCT ACAATACAG
901 CTGAGGCTGT TATTGATCAT ATTGATGGCG CACTTCACGA CGAAACAGGC
951 ACTCGAAGCG AAGTCACTTA TCGCGGATAC CAATAACGGA ACTATGGATA
1001 GTAGTACCAA AGAAGAGTTA CAGTTATTCA TAAATCAAAT ATATAGTTCC
1051 ACAACAGAAT TTAATGCGTA CGATTTCTTC ACGTTGAACA CACAAGTCAT
1101 AAAATCTGT ATTGCTGCTG GCGCTACATG TCTTGTTATT TTGGTCCAAT Tm = 60 (R)

```

[RESULTATS]

1151 TTCACTCCGA GAGAAATTGA

ApGr27: PCR with primers: 364 bps (expansion 21 ApGr)

```

1  ATGTTTGTGT  TTCGTAATTT  AACAATGTTT  AAGTTCTGCT  CGAGTAAACT
51  GCGATCCTAT  CTAGAAATAA  TGTTTTCTAT  AACTTTGGCT  ATGACATGTG
101 TGTACAACGT  TATACATTCG  TCTACATATG  TATGTACATT  GGTCACTTGC
151 AACGGGGATT  TGATAACATC  TGTAAACTCT  ATGTTTCCTC  GAATAATTGC
201 CATCGCGTGT  TTTGTCTCTA  CAATTTTCGAA  TATGATCAAA  AATTTAATAG
251 ATTTTCCCAA  GTATAATCAT  AAGATCAAAG  AATATGAACT  ATATTTTCCG
301 ACAAATGTTT  CACAAAATC  AATTCGGAAC  ACTTTTATTA  TATTTATTGG
351 ATTCGCATAT  ATCAGTATCA  TACTGCCATT  AAATATAGTA  AGGCTTTATT
401 TAATTCATTA  TAACAAGCAC  CGAATTGAGA  TCTTATTTTT  TTTTACAACG
451 ATGTACGTAC  AAAATTGGAG  CATTTGCCTG  ATAGAAATTG  GTTTTATTTT
501 TCGTTGTTTT  GGGTTGTATC  AGAAATTTCA  AATTATCAAC  GAAGATTTGA
551 TCGTGTTGAA  GACAGATACT  ATATCTAAAA  ACAAATATCC  GGTCTGTGTT
601 CGAAATGAAG  TGCAAAGCGA  CATTATTAAT  AATCCACGAT  TTCATACCTT
651 AGCCAAACAG  ATCGAATTAC  TTCGAATGAA  GCATCAATTC  GTCAGAGGTG
701 CTCTACGAGA  CCTTAATAAG CTGTACGGCA CTCAACTAGG  GTTGTCTTTA  Tm = 60 (F)
751 GTTTTCTTAT  TCATTTTGGT  TTTATTCGAT  ATCCACGGGG  AAGTAATCAC
801 TGAGGGTGCC  AAGACGAGAT  CTAAATATAT  TATTTACGGA  TGGATACTGC
851 AATACACGTT  CAGAGGTTTT  TCAATAATTA  TCATATCACA  TTTCACCACT
901 AAACAAGCTT  ACAATACAAA  AATGCTTTTA  GCTGATATAA  ATAATCGATA
951 TTTAGATAAA  ACCACAAAGG  AAGAGTTATA  CTTATTTTTT  GATCAAATAT
1001 ATCAAGGTTT  ATTGGAATTT  ACTTCGTGCA  ATTTTTTCAC  ATTACACCCT
1051 CATCTTATAA  CTACTGCTTT GGCTACGGGA ACAACATGTC  TTGTCATATT  Tm = 60 (R)
1101 ATTACGAATC  AATTAA

```

ApGr30: PCR with primers: 304 bps (expansion 21 ApGr)

```

1  ATGTTTAAAGT  TATATTTCAA  TAAATTCTTA  TCCAGTCTAA  AACTAGTATA
51  CTTTTTGGCT  TTAGCAATGA  CTTGTGTAAT  GAATTTAAAA  AATGCATCTG
101 CCACCGTTTG  TTCGTTGTCG  GAATGTAAAA  ATCCAGTAAA  GACAGAGGTA
151 TTAGCTATGT  TCTCTCGATC  TATTGCCATC  GCCTGCCTCT  TATGCAGAAT
201 CACGATTATG  TACAAAAGTA  AGAGCGATTT  TCCGAATTAT  GTGAAAAAAG
251 TCGAAGACTA  TGAATTATAC  TTTCCGGTAA  ATATCTCCCA  AAAAAGACAA
301 ATTCGATTCA  TCACTATAGC  TATAATATCT  TCATACATCG  TCATCATATT
351 GCCCATAAAC  ATAATGAGAA  TTTATTTAAT  TTACACTAAC  TTTGGTAAGA
401 TAAACACGAT  GATTTTTTAT  ACAATGATGT  ACGTACACAA  TTGGAGCATT
451 TGCTCCACAG  AAATACATTT  TATCGTACGT  TGTGTCGGTC  TGTACCAAAA
501 ATTCCAATCT  ATCAACGAAG  AAATGGCTAC  GTTGAGGTTA  AAAACCATAG
551 CCCGAAACAA  ATTCCCGGTC  GTGCTACGAC  AAAGTGAAAG  ACACGGTCAC
601 GATAACACAT  TACTTATCGG  TTTGGAAACC  CTCGGCGGCG  GTTCGCCACT
651 TTCGGTATCC  TCCAACGGAC  ATCAACCATC  CGACCACGTT  GAGCTACTCA
701 GGATGAAGCA  TCAATTTGTC  CGAGGCACCG  TCGTAGAACT  CAACGATTTG
751 TACGGTATAC  AGTTAGGACT  GTCGATATGT  CTATTGTTTA  TAATGACATT
801 ATTCGACATT TACGGCGAAG TGTCCGTCGA  GTCCAACGTA  ACCAAAACCTC  Tm = 58 (F)
851 ACGTTCTATT  CTACGGATGG  CTGCTACAAT  ACTCGTTCAG  ATTTTGTGTG
901 ATTGTACTAA  CGTCACACGT  TACCACAACA  CAGGTCACC  GACCAAAAAT
951 GATGATAACT  GATATAAATA  ACCGTTACGC  AGATAACAGT  ACAAAAAAAG
1001 AGTTAGAACT  ATTCTTGTGT  CAATTGTGTA  GTCGTCCAGT  AGAATTCACT
1051 ATCTGTGATT  TGTTACACT  GAACATTCAC  CTCATCACTT CTGCTTTTGT  Tm = 60 (R)
1101 TGCTGGTACA  ACTTATCTAA  TTTTACTATT  ACAATTCCAC  TGA

```

ApGr34: PCR with primers: 300 bps (expansion 21 ApGr)

```

1  ATGCGTCGTG  GATGGTTCGG  CCGATTGGCC  GGATCGGCAG  CCCAGGCCGT
51  GATGGGCGCG  CTGTGCGTGT  TGAACTTCGT  GATGACGCCG  TACTTCGAGT
101 GTCAGCTTGA  CGGAGACAGC  TGCGACGAAA  ACGTAAGCAT  AATGGCCGGC

```

[RESULTATS]

```

151 ATCTACGCGC GGTCCGGTGAG CATCACGTGC CTGGTGACGG TGGCCGTCGC
201 TTGGCACAAG TACCGCGGTG CAATGGTGGC GTACCGCGAG CACGCCGAGC
251 TGATCGACGC GTACTCGGTA CCGGCCACTG CTGCGGCCGC CTCTGCCAAT
301 TCGCTTTACG TCGACCACGC AACGTTCTCC GGTGTCGTGT TGTGTGTGTG
351 CATGGTGCTC ATCTTACCCG TCAACTCGTT CCGTTTGTAT CGATTTGTTA
401 TGGACGACCG ACCGGTGACC GCGATCGTGT ACTTCGTACT CATGTACTCG
451 CAAAACATTT ACGTGTGCCT GTACGAGACA CTCTTCGTGC GGCTGTTCTA
501 CGCGCTGTAC ACGAGGTACG CGGACCTCAA CCGGGATATG GAGGCCATCG
551 GCGAGCGGAT CGAGGACGGT CGGTGCGCGC GCGACGAGCC GCCGCCCGGC
601 CGCGATGGTT GGATACCATA CGACGGGGAC GACCGACACC GACCGCACTA
651 TTTCTATTAC TCGCCGGCCA CGGGACAGCC GCTGGAGGAC GCGGTGGAGC
701 GGCTCCGGAT CAGGCACCGG CTGATCCGCG AGGCCATGGA CGCTCTCAAG
751 TCCGCGTTTG CCGTGCCCAT CGGCCTGTCT GTGTGCAACC TGTGCGTGT
801 GGTCCTATTG ACGTGTACTT ACCACCTGAA GAACTCGGTC GGTCAACCCG Tm = 62 (F)
851 CCGGCGACTT GGCCAGGGTG TACATATTCA TGTGGATCTC CCAGTACACG
901 TTCCGATTTT TCGTCATCAC CATGACAGTG GACGTCACCG TGAAACAGGC
951 GAGCACTCAG GTCGAAAGAA ACAATAACGG ATGTGAGCAG ACATTGTTTA
1001 GATATTAGTA CGAAAGAAGA GTTACAAATA TTTTCAAATC AAATATCTAG
1051 TACTGTGATA GAATTTACGA TGTGTGATCT TTTCACATTA AATGCACGCC
1101 TCTTCACATC TCGCGTGGGT GTCTGTATTA CGTACCTTGT AATATTACTT Tm = 62 (R)
1151 CAGTTCAAAA TAAAGGCGGA TAATGTTTAT TAG

```

ApGr45: PCR with primers: 489 bps (Aphid Gr Clade A)

```

1 ATGTCGACTG TTTTTCAAAC AACTCAAAGG CCAGTCTTAT TTTTATGCAA
51 GGTCGTAGGC ATCATCAACA TTTCTTATAC AACGGGACCC GACGGGTTAC
101 TAATTCAAAA CACCAACTCG AAGTATAGAT CATTCTTTGA ATTGACGCGA
151 ATGATCGTGT TGATTATAAT TACTTGGGAG GTTCAAAAAC GAATCTTATT
201 ACCGCAAAAA ATATCTATAT TCAAATGTTG GGCTGTCATT ATCTCAGCAA
251 GAATATCAGA AAAATGGATA ATAAAGTGA TCAATGGCAT TATAGAATAC
301 GATCAAAAAC TATCATCCGT CTTGACAGTT TATTTTGAAC ACCGACGTCC
351 GATCGAAAAA AAATGCTGGA GCATAATTTA TTGTTGTACG TTCGTATATT
401 ACGTCGCAAT TTCAATGATA CTAATGTGGA TCTTGCCGAT GAAAGAGATC
451 AATATTATGA CCATTTTATT TTATTTTATT CGTTGGGGTA CCATCGTAGA Tm = 60 (F)
501 CATCGCCGTG GTAATTTCTA CTTATTTTTA CCTGAAAAAC TTGGAGTGTA
551 GATTCCAAAC GTTGAACAAT TTCTGGACAC AACTTCCGGA CGGATTTACG
601 ACGATTCCCG TCATCGTTGG TGGATGGTCG AATCCCGAAA TCGTTACGAT
651 GGTGGATAAC GTTCGACGGT TGCACGCTGA ACTGTCCAAC CTGTTGCGGA
701 TATTCAGTAT GGGTTTCGGT CAAATCCTCT TGGCATTCTT CGTATTCAAT
751 TACATCGATA TAATTTTCAA TTTTTTTAAAT TGGATTCAAT TCATAGGACA
801 TAATTTTGGG ACAGTAAATG TTAATGATGT ATTGATAAAA TTATTAATGT
851 TCATGACATA CTTACAAAAT TTAATTTTGG TCATGAGCAT TATCATCGCA
901 GCCTCGCGCG TGAAAGATAC GACATTAAAG TTTTGTAATA GGTGCGCGCA
951 CCACTTTCTT TTAGTCTGCG GGTTTGGATT TCCAGGTAAT GTAAGATATT Tm = 58 (R)
1001 TTATGAGCCA ACTAACAGTT TTTGATTTGG ATGAAATAAC AGCTTTTGGA
1051 ATTTTCAATA TAAATTTGAA TCTGGTTATG TCAATAATTA TTCTTCTTAT
1101 TACTGGATTT ATAACAGTGA TTCAGATGAA GAACCAACCA TTTACGTTAC
1151 ATTTTATTAA TGATACATTA GAATTCTATA CAAATTTAAC TAAAAGGTTT
1201 AAAAATACAA CTAATATTTT GTCCTAA

```

ApGr56: PCR with primers: 377 bps (Aphid Gr Clade A)

```

1 ATGATGACTG TTTTTCAAAT AATTTTAAGA CCTATTTTAA TTTTATGCAA
51 GTGTATAGGA TTAATTGATA TTTCATATAC AGTGGACCAG ACTGGATTTT
101 TGGTTCAAAA AAGAACTTCA ACGTTTAAACG TATTTCTAGA AATAGGACGG
151 ATGGTTGTTT TGTTAATATG CACTTATTTA TATGTTTCATC AGTTCAAACA
201 AGATTGGTTT GTACTTCAAA CATTACATAT ATTTAAATTT TGGATTATCA

```

[RESULTATS]

```

251 TTATCGCAGC CAGACTATCA ACCAAATGGA TAATTAGATT TATTAATGGA
301 ATTATAGAGT TCGATCAAAA AATTATACCA CTTTCAACAA ATTTGGTGAC
351 ACCACAGCGT TCATGGACAC AAAAACATTG GAATACGATT TTCATATCAT
401 TATTTGGATA CTTTATTGGA TTAAAGATTT TATATTATTA TTCTCTGCCC
451 TTTTCATCTTG AAAACATAGT AATATTGACA ACCCATGCAA TATTCACTAT
501 ACCATTTGTT ATGGATTATG CAGTTACAGT CTCATCATGT TTCTTTCTTC
551 AAAACGTATA TGCCAGATTC CAGACGTTAA ACGATTTTTG GAAATGTCTT
601 CCTGCCGACT TAGTTGCCAC TTCCGACAAA TGGACACACA TCAAAATAGT
651 GGATTTGATG GAAAACACGA GGCTGTTACA TTCCGAACTC TGTGGTTTGT
701 TAAAAATGTT TACTCTTGGT TACGGTCCAT TGCTTTTAGG GTTATTCCACA Tm = 60 (F)
751 ACCAGCTATA TCAATTTTCT TGTCGGTGTT TATTTTATTG TCAATAATGA
801 AGTATTTCCC AGCTTTCATT CAACCAAAAA TAACTTGGTA CGATTATTAC
851 ATCTAATGGT CCACGCACAA ATTGTCACGT TTTTGATGTC CATTATCGTT
901 TTCGTTTCAT TCATAAATGA GAAGATATTG AAGATGATAT CATACTTACG
951 GTTATATCGA ATTTCAAATT TACACTTGGG CAAAAACGA CAAATCAAAA
1001 TGTTTATGAA TCAAAATATCA GTTTGCGATT CGGACCAAAT TTCGGCATTC
1051 GGGTTTTTTT ATATAAATTT GAATCTCGTT ACATCGATCC TCGTGTTATT Tm = 60 (R)
1101 GGTTAGTGGA ATAATCACAT TGGTACAGAT GAAGGATCAC CCAATGATAT
1151 TGAAATTTAA CAATGACACT AAATCCTTCA ATTATATTAT ATCAATTATA
1201 TTATATTAA

```

ApGr73: PCR with primers: 364 bps (Aphid Gr Clade A)

```

1 ATGTCGACCA CTTTTAAACA AACAATCAAA TTCTTCATAA TCATATGGAA
51 GATAATTGGT TTACTACACT TTTGTTGTAC AATGGAAACG GAATCTGGAT
101 TAATACATCG GGACATGAGC TCAACGTTTA ATTTATTCCCT AGAAATGATA
151 CGGATATTTG TATATTTAAT TTGTAGTTAT CATATGGTGT ACAATATGGG
201 AGAAAATTAC CTAATAATAA ACTTCAATAT ACTTAAATAT TGGTGTATCA
251 TCATACCTGC AAGAATGTCG GAGACACGGA TTATAAAATT AATCAACGGT
301 ATCATCGAGT TCGACCGGAA ATTGTTTTTA TTTAATTCAT TACTGGTTGT
351 TGAATTGCCT ACATTGAGTA AAACGTTTTG GATTGCTTTT GTAGCCATAT
401 TTTCTTTTTT TTTTATTGGA TGCCAATTAT ATTTAATACT TAATGGTATT
451 ATTTTGAATT TAGAAAATGT TCATTTTGCA AGTTTATTGT TTCATTGCCC
501 AGACATAATT ATTTTATATG TAATGGCCAC ATCATATTTT CATCTCATT
551 ATTTGCGACG TAGGTTTTGT ACTTTGAATA GACTGTGGAA ACTCTTACCG
601 TCTGGAATAG TAGCTTTGCC AGGTGGATGG AGTAGCTCTG AACTAACAGT
651 GGTAATGGAA TGTATACGAT TATTGCATGC TGAACTTTCT GAACTGCTTC Tm = 60 (F)
701 GGTTGTTTAG TTTGGGTTAT GGTCCAGTAA TATTAATATA TTTTACATTT
751 ACATTCATCC ATGCTTTAGT CGACATATTT CTTATAATTG TTTTGTATAA
801 TTCGAGTGTA AAATTAGGGA TTTTGTCAAT CGTGTTTTAT ATACAATACA
851 TTATGTCCAC TCTATCAATT CTCTGCATTA CATCGTGGGT TATTAAAAAG
901 AAAAAAAGA TTATTTTATA CTTGAGACTG ACGAGAATTT CAGAATTGCC
951 TACTGAAACA AAATTACAGG TTTAAATATT CATGAGTCAA ATATCAGTTT
1001 ATGAACCAA TGAATTGACA GCCTTTGGAT TTTTCAACTT GAATTTGAAT Tm = 60 (R)
1051 CTATTCATGT CAATTTTGGT ATTGATGATC ACTGGAATCG CTACATTAAT
1101 TCAAATGAAA GAGTATTCGT TCATGATTCT ACTTAATAAT ATAATGACAC
1151 CTCAATTCCC AAAACTAGAA TGA

```

[RESULTATS]

PRIMERS for Obps of *Acyrtosiphon pisum*

The unreported genes gave a very weak or inexistent signal in PCR from poly A RNA of the total aphid and therefore were not further analyzed in wing

ApObp1: PCR with primers: 375 bps

```

1   ATGTTGAATC TTAAAGTGAT GATGTTTCTG TGCTTGTCTG TCATCGTTGT
51  TTACTGTGAA AGCGACCAAG TCCCTATAAA TAGTAGCGCG GCAGTAGAGA Tm = 60 (F)
101 GTTGTCTATT GGAAACAAAT ATGACAAGAG ATGAATTTGA AGATATGTTA
151 ACGTCGCCTA ATGCTCGCGA ATTAACAATA CTTAAGTCGC ATGCCCATAA
201 ATGTATGTTT GGTTGTGTGA TGAGAAAAAA CCACATTGTT AACGACGGCG
251 TTGTTTCTAA GGAAGTCTTG AGCAAATATG TATTGAATTT CTACGGAAGA
301 CCCGATTACA AAAGACGTTT GATTATTAAA GATGTGGAAC ACATCGTCGA
351 TGTTTGCGCT AAGAAAGTTG CAGATGAGTC GGAGACTGAT GAGTGTGAGT
401 TAGCCGCAAC CTTAGTTACT TGCATAGTGT TAGAAGCCAA CAAGGCGGGT Tm = 60 (R)
451 CTAGTCGATG ATCCTGCACG TCAGATTTAA

```

ApObp2: PCR with primers: 275 bps

```

1   ATGAAGGTAT CTGCAGCGAC CGCCGTCCTG GTCGCTCTGG TCGCCACCGT
51  GCAGAGCTCG GACCCATGTA ACATATCTAC TTGCTACAAG AGCGGCACGA
101 CGAAGCCGCC AATGGCCGTT ACGCCCACTC ACCTGCCGGT ACAGTCATCG
151 TCCACCCAGA CCAGCCACCC ACAGACCACG TACGCCAAGG ATCACGTGCA
201 CGGTTCAACC ACCACCAAGT CCGGTGTCAA TGCTACGGTC ACGACAGCCA
251 GCGGAGCGTC CGTCAACGGC ACTGAACCGC CGGCCGTCGT CAAGTCTTCC
301 GCCGGAGTAA CCGGAAACTC CACCACGCCC AAGCCTACAA TGACCGAAGG Tm = 60 (F)
351 ACATGTGGCT CTGAAACAGA AGTTGAACAC AATTGCGGTG AAGTGCAAGG
401 ACGAGCTGCA CGCGCCCCAA GAGATCATGG CACTGGTCAG TAACACGGTA
451 GTACCGCAGA ACGAGCAACA AAGGTGCTAC TTAGAGTGCG TGTACAAAAA
501 TCTTAATTTG ATCAAAAATA ACAAGTTCAG TGTGGAAGAC GGCAAGGCGA
551 TGGCTAGAAT ACGCTTCGCA AATCAACCAG AAGAGCACAA GAAGGCAGTA Tm = 60 (R)
601 ACCATAATAG AAAGTTGCGA AAAAGAAGT GTTATCGATC CGAAAACAC
651 TGAAAAATGC GCAGCTGGAC GAGTAATCAG AAAGTCTTC GTCAAAAACG
701 GAGAAAAAT AAATTTCTTC CCTAAAGCAT AA

```

ApObp3: PCR Wwth primers: 228 bps (new primer R2 303 bps)

```

1   ATGAATTCGT CGACATTCTA CATAACGTTT CTGTTTGGTA TTGCGATGCT
51  GATTTTCATGT GGCTACGGGA CATTTCAGAC GGAACAAATC GATTACTACG Tm = 60 (F)
101 GAAGAGCCTG TAATGCAAGC GAAGATGACC TCGTCGTAGT CAAATCTTAC
151 AAGGTACCAT CTACAGAAAC TGGAAAGTGT CTGATGAAAT GCATGATCAC
201 AAAACTAGGA CTGTTGAACG ACGATGGTTC ATACAACAAA ACTGGCATGG
251 AAGCGGGATT AAAGAAATAC TGGTCGGAAT GGTCTACGGA GAAGATCGAG Tm = 60 (R)
301 GCTATAAACA ACAAGTGTTA TGAAGAAGCT TTACTTGTGC CAAAAGAGGT Tm = 60 (R2)
351 AGTAGTGACG TGCGATTACT CGTACACTGT GATGGCATGT CTGAACAAGC
401 AGTTGGATCT CGACAAGTTA ACTTAA

```

ApObp4: PCR with primers: 276 bps

```

1   ATGCGTGGAA ATTATTCTTC GATGGTTTTT CTACTTTTTG CAATTGGATT
51  TCAAGATATT TTCTGTCAAA AACAAGAACC ATCAGGAAAA TGTAGAGCTC
101 CCGATAAGGC ACCTTTAAAT CTCGAAATAA TAATTAATAC ATGCCAAGAA
151 GAAATCAAAT CCGCATTACT TCAAGAAGCC TTAGATATTT TAAATGATGG
201 CAATGTGGAA CAAAATACGC CAAACTATAG CAGTAGATCA AAAAGAGAGG
251 CCGAAGAAGA TTTGACAAAC GAAGAACGTA GAGTTGCAGG GTTTTGCTC Tm = 60 (F)
301 CAGTGCCTCT ACAAGAAAGT GAAAGCAGTT GATGAAACTG GTTTTCCGGT
351 AGTAGACGGC TTGATGAAAC TGTACAACGA AGGTGTCCAG GACAGAAACT

```


[RESULTATS]

```

401 ACTACATAGC TACGTTATCC GCAGTTAGGC ATTGTATTTT TATCGCGCAA
451 CAGCTAAAGC AACAGCAGCC CTCCAAAAGT TTCGATGACG GACAAACGTG
501 TGATCTTGCA TATGAAATGT TCGAATGCGT CAGTGAAAAA ATCGAAGAAA Tm = 60 (R)
551 ACTGCGGAGT CGAAAATAAG TCAAATAACT GA

```

ApObp5: PCR with primers: 237 bps

```

1 ATGTCCGCCA ACTCTGCGAC GATCAAGTGC ATCGCGGTGG CCGCCATTCT
51 GCTTCAAATA TCCGTCATTT TCGGGATGC AGGTCACCAC AGACGCGGCA
101 AAGAGCTGTT GGACACCGAA GACAGCGACT TCTTCCGGTG CAAACAAGCC
151 AGCAGGAAGT CGTGTGTGG CCCGAAAAC GCAATGAAGC GATTCGGCGA
201 TAAAGACAAA GTAGCAGCTG ACGAGTGTTA CGCACAAGTA GCCGAGAAGT Tm = 62 (F)
251 TTGCAACGGT TACAGCTACT ACACCCAAAC AAGACTTGTT TTCCGCTGAA
301 GCTGTAAAGA TTACCAAGAA GAAGCAATTT TGCCTTCACG AATGTATCGG
351 CAAGAAAAAT AATTTGCTCA CCGAAGACGG TTCCTGAAAC AAAACGTTCA
401 TAGCTGATTA CGCAATGAAG AGCGTCTTCA AAGAACAGTG GCAGAAACAA Tm = 60 (R)
451 GTGGGGCAAA AGGCCTTAGA CAAATGCCTT GAGGAGACCT ACAACCGTG
501 GCCAGCAGAA GATAAAGAAA ATGTGTGCAA TCCAGTATAC GTACAATTCC
551 AACACTGTCT GTGGTTGCAA TACGAATCGA ACTGTCCAGC CAACAAGATT
601 AAGATCACC AAAAAATGTA GAAGACGAGA AACCCTTACA GGATGCAAAA
651 ATCGACATCA AACTAA

```

ApObp6: PCR with primers: 515 bps

```

1 ATGCAAAAGG TGGTTTTTAT ATGTATTTTT GCGATCATCT GCCAAACAGT
51 ATTTACTGCT GGGTACGATA GAACATGGAT TTTACGCCAA AAACGAGGGA
101 CAAATGATGA CGAATGCCGA ACTCTTCTTC CAAGCTCGGA AAAGAAATTA Tm = 60 (F)
151 CCTTCATGTT GTCAAATGCC AAATATATTA CCCAATTTGG ACAGTACTTG
201 GGAAAAATGT TTTGAGACAT TCAAACAATT CAAGGATAAA CCTGAAACAA
251 AAGAGTATAA GGAAATGGCA CATGGAAAAG AGCCACCATG CCTTTTTTCAA
301 TGTATTTTCA TGCAATCTGG ATTAACCTACT AGTGATGGAA AACTCAATGA
351 AGATGCTATC ACAAAAAAAA TGAGCGAAGG AATAAACAAT GATGAAAAAT
401 GGAAGTCTAT ATGGCAGAAT TCTCTCAATA AATGCTTTGA TGATGTCAAA
451 CAAGAAGATA AAAAACAAT TCTAATCATG AATACTCCAG CAGGAAGATT
501 GATGAAATGT TTCTTAAGAG ATATGTACAT GAGCTGCCCC AAAAATGTAT
551 GGGTTGAAAG CTCAGAATGC TTGAACATGA AAGATTTGGT GCAAAAATGT
601 CAGAAATGC CCCCGCCAGT TTTCAAATCA CCACCTAAAT TAATCTAA Tm = 60 (R)

```

ApObp9: PCR with primers: 268 bps

```

1 ATGATAATCA AAAAGACATT GTTGCTATCA GTTTTCGTTT TTTTCGGTTG
51 TTTGTTCTCA ATCAATAAGG CTGATGATGC AGATGCAAAG GATAAGGAAT
101 TAATGTCAAA ATTATTCAT GTGGTTTTTA AATGCTTTAA GGATGCCGAT
151 TGGGGACGT GCGGTGAAAT GATAACAAT AAATATGACA TAACTCAAGC
201 TAAATATAAA CAGTGTACAT GTCACATGGC GTGTGCTGGG GAAGAAGTTG Tm = 62 (F)
251 GAATGATAAA GCCTTCGGGG CAACCAGAAC CTGCGAAGTT CCTCGAATAC
301 GTGAACAAAA TCAATAATCC AGACATTAAG AGTCAATTGC AACTTATTTA
351 CGACAAATGC CAAAATGTCA AAGGGTCGGA GAAATGCGAT CTCGCAGAAC
401 AATTTGCCAT ATGTGCTTTT AAGGAATCAC CAGCATGAA AGAACGCGTT
451 TCTACGTTGA TGGAAATGCT AGTGAAGATG AAACCAAAAT CAAAATAA Tm = 62 (R)

```

ApObp10: PCR with primers: 265 bps

[RESULTATS]

```

1  ATGGAACATT TACGTAGCAC AAACGTTGTG TTTGCAATTG TAATGGCATT
51  GTTGGTAGTA CAGTCATCTA CACGACCACA ACCAGATGAA ATGGAGGAAA Tm = 60 (F)
101 TAAAAAGAAC ACTGTACAAT GCATGTGCTG GAAAGTTTCC AATTACGGAA
151 GAATCAAGA ATAACGCGAA AAATTCAATA ATTTTCAGATG ACCCAACTTT
201 TAAATGCTTT TTAAAGTGTT GCTTCGACGA GATGTCAATG ATTGATGAAG
251 ACGGTATTAT CGATGGGGAT TCATTGAAAG CAATGGCTCC GGACCATATT
301 AAGCCGATCT TGGAGCAAGT CATCCCGAGT TGTACAAAAA ATGTTAAGCA Tm = 60 (R)
351 AGATGGTTGT GAAGCTTCTT TCGAATTTAT AAGCTGTGGC ATAAAATTAA
401 ATCCATTAAT TGTTGCACTC CTACCACTGT GA

```

ApObp11: With primers 256 bps (new primer R2 322 bps)

```

1  ATGAGTTTCGT CGACATTCTA CATAACGTTG CTGTTTGGTA TTGCGATGCT Tm = 62 (F)
51  GATTTTCATGT GGCTACGGGA TATTTACGAC GGAACAAATC GATTATTACG
101 GAAAAGCGTG CAACGCCAGC GAAGATGACC TCATCGTACT CAAATCCTAC
151 AAGGTACCAT CTACAGAAAC TGGAAAGTGT CTGATGAAAT GCATGATCAC
201 CAAACTAGGA CTGTTGAACG ACGATGGTTC GTACAACAAA ACTGGCATGG
251 AAGCGGGGTT AAAGAAATTAC TGGTCGGAAT GGGCTACGGA GAAGATCGAG Tm = 62 (R)
301 ACTATAAACG AAAAGTGTTA TGAAGAAGGT AATACTGCCA CCCTTCTATA Tm = 60 (R2)
351 TCACGTGGCG ATTTACTTTA CTTGTGTCAG CGGAGATTAT AGCGACGTGC
401 AATTACTCAT ACACTGTGAT GGCATGTTTG AACAAGAAGT TGGATCTCGA
451 CAAGTTAACT TGAAACTCTT GATCATGTTG AAGATTGGAC TGAGTGAACC
501 GAAAAGATAG

```

PRIMERS for Grs of *Apis mellifera*

Honey bee (*Apis mellifera*): House-Keeping Gene Ribosomal protein S8 (RpS8): 173 bps

```

1  atgggtatatt ctgcgatca ttggcataag aggcgagcaa ctggtggttaa
51  aagaaaacca atccgtaaaa agagaaaatt tgaattaggt cgtccagctg
101 caaatacgaa acttggacct caacgtattc atacggtatg taccagaggt
151 ggtaacaaaa aatatagagc acttcgttta gatacaggaa atttttcatg
201 gggatctgaa tgtactacaa gaaaaacacg tattatagat gtagtttata
251 atgcatcaaa taatgaattg gtgagaacaa aaactcttgt aaagaatgca
301 attgtcacta ttgatgcaac acctttcaga caatggtatg aaggtcatta
351 tgtttttacca ttgggtcgta aacgaggtgc gaaactgact gaagctgaag Tm = 62 (F)
401 aagaagtttt aaataaaaaa cgttcgaaaa aagcagaagc taaatataaa
451 gcaaggcaac gatttgctaa agttgaacct gctcttgagg aacaatttgc
501 tacaggacgt gttcttgctt gtatatcgag tagacctgga cagtgcggtc Tm = 62 (R)
551 gtgaggatgg ttatatactt gaaggaaaag aacttgaatt ttatatgaga
601 agaattaaaa gcaaaaaagc caataaa

```

AmGr1: PCR with primers: 351 bps

```

1  atggtaactt gggagaagct tgagaaagag ctttcacaga ggcatagaaa
51  aattttccaaa atcagtcttt ccatgaaatt caaaatcgtg acaatagtgg
101 tgatgacatt tgcattagtt gagcacagtt tatcgataat ccacggttac
151 ttcaaggcga aagaatgcat cgaatttcatt cgagagcaga gtattcttgg
201 cgtgtatttc cagatgcaat ttccacagat attttctaga acctcgtaaa
251 gtttatggaa gggaatatgg gtagatatca ttaatatcct cagtacattt
301 tcgtggaatt ttgtggattt gtttctcatt cttatcagca tcgctctaac
351 ggatcaattt agacaattaa acagccgctt gtattctata agaggaaagt
401 atcattttcat tgtaaggca atgccggaat ggtggtgggc cgaggcaaga
451 agtgactaca accatttggc aaccttaacg agacaactgg actcccatat
501 ttccattatg gttctcctat ctttcgccac ggacttgtat ttcatctgca Tm = 60 (F)

```

[RESULTATS]

```

551 tacaactact tttctctttc aagataacta ttaaagtgtt gaacagcccg
601 atgcgaggta ttatcgagaa aatctatttc ggattctcct ttggattcct
651 tttggctaga acgacggtag tctcgctgtg tgctgcgacg attcacgatg
701 aatctttact tccagcaccg attctctaca gtgtttccag tagcagtttt
751 tccacagaag taatgagatt tctatcgcaa gtaacgacgg ataacatctg
801 cttgaccggt atgaaatfff tctcggtaac cagaagcctc gtattgactg Tm = 60 (R)
851 tagcaggaac catagttaca tacgaattag ttctagtcca gtttaatact
901 actcagcaaa ctgatgcgtc gaacgctaca attgtatgcg aggtgaagta
951 a

```

AmGr2-2: PCR with primers: 408 bps

```

1 ATGCATTCGG AGGATCAAAT CCAACTTATG ATGTTAAAAA CAAAAGATGG
51 TTTGGGCGAA ATACCGAAAG GCAAAGGCAG AGGTTCCAAT TTGAAGATAT
101 GGTCCTCTGT CATGTATCAC AAGGATGACA ATAATATCGA GGATATTAGC
151 GCGAATCAAG AGAACGATTT GTCCACCAAG CGACCTCGAG CCGAACGAAA
201 TTATTTCAGA AATAGCGAAG CATTAGAGAA TTTTCACTGT GCAATCGGCC Tm = 60 (F)
251 TGTGTTTTAA GGCCGCTCAA ATATTCGGCA TGTTCCAGT ATCCGGAATT
301 CGATCTTCAT CGTTATCAAA ACTTCAATTC AAAATATTTT CACTTCTCAC
351 TATGTATTCA GTTTTCATCG CCTTAATGAT TTCGTTTATG ACGATTGTAT
401 CGATGATACA CATGTTGAAA ACTTTTAACG CCAGTACATT TCAAATTCGT
451 GGTGGCTTAG GCGCAGCGAC AGTCGGTGCG GTGTTCTATG GGAACAGTCT
501 GGTGGGCGAG ATCTTATTTT TCTCATTATC GTCACGCTGG GTATCTCTTC
551 AATACGAATG GAGAGCCATG GAACGATATA TAGACAGCAA TTCGACAGAA Tm = 60 (2R)
601 CCCACACGGC TTCGATGGAA ATTTTTTATC ATAAGCACGA TGGTGCTGGT
651 TTTGTCTCTT ATAGAACATG TTCTAAGTAT ATTTAACAAT ATCGATGGTT
701 ACGAGTGGAA CGAATCAAAT TCGACGTTTC ACAATTTTTT GGAGATATAC
751 ACATTACGAT CCCATTCGTT CATTTTCGAT ACATTGAATT ATAACTTTGT
801 ATACGGTTTG TATGTCTTTG TCGTTAGCAA ACTAGCGACT TTCACATGGA
851 ACTTTACAGA TTTATTCATC ATGCTTGTG CCACTGGTTT AGCTGAAAGA
901 TACAAATCTT TGAACAAGAA ATTGGCAGTT ACGATGACGA AATGTCAAGC
951 GGCATTTAAT TGGCGCGAAC TTCGGGAGGA TTATGCGATA TTGAGTTGCA
1001 TTGTGAAAAA AGTGGACGAT CACATTTCTC CAATAATCCT TTTATCTTTT
1051 GCAAACAATG TGTACTTCAT TTGTCTTCAA TTATTAAACG GCCTATCTAT
1101 ATCAGATAAA AACAGTGTAT TGAGCGAGGC TTACTTCTTT Tm = 60 (R)
1151 CTTTTCTTAT CTGTCGCACG TGCGCTGTTA CCTTACTTAC TGCTAGAATA
1201 CACGATCAGA GCAAGCAAGC ATTACCTTAT TTGTATAATT GCTCGACATC
1251 TAGTTATAGC GTCGAGGTTT AGAGATTACA ATGTCAACTT GCGACAGACG
1301 ATATAGCTTT AACTGGATTA CGTTTCTTCT CTATTACAAG AAATTTTATG
1351 CTTGCGGTGG CTGGAGCAAT CATAACATAT GAAGTAGTAC TTTTACAATT
1401 TAATGGTAAA TAA

```

AmGr3: PCR with primers: 562 bps

```

1 atggaggtaa aacgagtaga agaaaaaagg aaaattctgt ttaacaatga
51 actttgccaa gcaatctttc cgatatatta ccttggtaaa ttttgtggct
101 tggttccagt aagatfffft gtgcatactt ctgaaggatg tcaggctcgt
151 ttaaataatta tagatcttat ctatagttta tgcgtacttg tattactact
201 tagtgcgga aatttggggt tatggagaga tttaaaagat ggttgggaat
251 atagtaccag attaaaaatc cgaacagcag taatcgcaac ttgtagtgat Tm = 62 (F)
301 gtgcttgggg taatgagttt aactgtgggt tgtattgttg gctctccttt
351 ccgttggaaa tatttgcaac ttgttataaa caaatataat gaggtggatg
401 aaaagatcgg cgtatcatct gcaaaagtgg ctggaagatt cacgattgtg
451 ctaacaatat gtacctaag ttatctctgg ttcaattcaa ttatagattt
501 ttacacgtgg aatcgtaaaa caaaagtcga taataaagcg atgaccggca
551 aaggctctat taattatgca cctctatatt tcatgtatac agtaattatt
601 tcgacagaaa ttcaatacac tgtctcaaca tataacatag gacaaagatt
651 cattcgttta aatactagtc tcaaggattt gttcaatgca aatagcaaca

```

[RESULTATS]

```

701 acaatgacaa tgcaattgat tattttcgaa aatgtccaga gacagcagct
751 catgatatgg atgacaaaaa aatatggaac ctcaaaccac aacgtcaaat
801 tgtatttaggc agctatagac tatcgcgaaa attagatgag aataaaatgt Tm = 60 (R)
851 acgtgaacaa catatctgaa ttgataatgg ttcattcttc gctttgtgat
901 gcagtctctc ttataaacag tacatttggg gttgtgatat tggctgttac
951 tgtaacctgt ttattacacc tagtcatcac accgtatttt ttaatattac
1001 aagctgggtga aagacatgaa tggatatttc tgattgtaca aggtggatgg
1051 tgcattcttc acataactag aatgctgata attgttcaac ccagttattc
1101 tgcaattgca gaggcaaaaa aaacggcagt tctcgttagc cagttacttt
1151 cttgtacttt tgaagcaaat atccgacgcg aattagaaat attttcgctt
1201 caattgttgc atcggcctct cgagttttca gcatgcggaac ttttttcctt
1251 ggatagaaat ttaataacat cgattgcagg agttgtgacg acgtatcttg
1301 ttattctgat acaatttcaa aatgcagatg acacaaagga cgacttcgat
1351 attataagaa atgcaacaca gattttaaag aatgcatcac cgcttcagaa
1401 ttttaccgga ttgaagacca ttgtataa

```

AmGr4(5): PCR with primers: 236 bps

```

1 ATGGTAGATA AATCATATTG GTCTCGAAAT ATGGATCGAT TGA CTTTGCT
51 ATTCTTTTTT TTCTTCAAAT TTGCCGGTCT TGCTACGTTT TCTTTAAATA
101 ATCGAGCAAA TTTAAACAAG AAGAACTCGG AAAATACCAT GTTTTTTATC
151 AGTTCTAAAC TGGGAATACT TTACAACCTG TTTGGCAGCT GTCTAATAAT
201 CGCATTGAGT TTCTACTCGA TACCAATTAC AATGTATGCA GATTATGTTT
251 ACAAACAAT TGTAACAATT ACCATAGAAA TTTTCCTAAT AATATTAGGC
301 TGTTTTGTTA TGA CTTTCAAC TTTATTATTT TATTGCATAT TTGAATCGGT
351 TATCATAAGA ATTGGAAATT ACTTAATTAA TATTGAAAAT GTGTTGCGTC
401 ACTTGCAACA ACCACTAAAT CGAAAACACA TTTTAAATGT TTTATTTTTC
451 ATCTGCTTAT TCATGTTAAT CTTACTCATC ATTCTTTTGA TTA CTTGAAAT
501 CAAAAATTTT AATCCTAATC CATTAGTACT AATGGCAAGT ATTATACCTT
551 TGATCTTCGT AGGTTTGCTT TTCATTCAAT ATTTTTTCGT GCTTAATTTA
601 ATATATGCAA TTTTGTAAA ATTAAATTGC ATTATACAAA GCTTTTGTCG
651 AACTAGATAC GATGATATAA ACTTTAAAT TTTGAATCAG ACTCGATGTG
701 TGTTTATGAG TTATTCAAAA ATTCAACTTT TTATTCAAA TCGAGACATT
751 TACGATCATC TTTGCGATAT TTCCAGAGAA GTTTCAGACT TTTATTCTTT
801 TTCTATTCTC ACAGCACTCT CTTTTATTTT TTTGGTAATA TTATACAACT
851 TTTATTATCT TTTTTTACAT TTTGTTAACG ATAAATTGAA TTTTTTACTT
901 ATTACAAATG CCATAATTTG GATAATGTTA CCATTGTCTC TTCTTGCTTT
951 GCTAACTTCG AAGGTAACCA ACGTGATAAA TGAGATCGAA AAAACTGGAT Tm = 62 (F)
1001 GTATTATACA TGTTTTGTTA AATTGTACGA TCGATCGAGA AACGAAAATA
1051 GAGCTCGAAC AATTTTCACT TCAATTGTTG CATCAAAAAG TGAAGTTTAC
1101 AGCGAATGGA TACTTCACAT TAGATAATAC TCTTTTCAA TCGATGATTA
1151 ATACAGTAAC TACGTATATG GTGATTTTGT TTCAATTTCA AATGGAAATT Tm = 60 (R)
1201 TCAATGAAA ATGATAAATT CTGCAATTGC ACGCAATGCA GATAA

```

AmGr7: PCR with primers: 235 bps

```

1 ATGTACGAGC CTAAAACGCT CAAAGAAACC ATCAAACCAT TGATGGTGGT
51 AAACCTTCGTG TTCGGCATGG GCCTGACCGG TATCGAGGCA AAGAAACCTT
101 CGAAGAACT CGAATACGTT TACACGCTAT GCAATCTTGT GTTATTCTAC
151 TTCATCAATA AATTAACCTT GCCTTATTAC GACAAATACT ATGTCATCAG
201 CACGTTTCGAG CTAAGTCGTT TCATATTTCA ATGGATGTTT CACGCGAATA
251 TTTGGACGAT AACACTGTTG ATTATCATTA CCAGGATAAA AGCACAGTAA
301 TTACGAACAA TAGTGTCACT TGTAGAATTA AGCGATCAAA AAATGGAAAA
351 CATAGGATTG TCACCGAAGC ATCGTTGCCT GATGATGTAT CAGATCAAAA
401 GATACATATT CCTTGGAATA TACACGCTCA TCTTCGTTGT GTTGATCTAC
451 CATTGTCATT ACGAATCAAC CACGCCAGCG CTTATTAAAT TATGCCTTTC
501 CATTTTACCG AACATTCCGT TCATAGTGTT CGGCGTCAGC ACCATCTCCT Tm = 60 (F)
551 TCTGCTTCTG GGTACGTTGC TTGAAATTAA AGTTTCGTCA GTTGAACGAG

```

[RESULTATS]

```

601  TTATCTTCGTA GTATGAGAAT CATGGAATCG CCAATTCACA AAAGAGTGTT
651  GGAAATGACG AATAATTTTCG AGAACAACAG ATTTCGCTTTG TACAGGAATG
701  AACACGTAAG AAGGAACACG AACACTATAA GAGCAGTAAA GCAAATCCAT Tm = 60 (R)
751  CTGGAGATAA TCAAGATCGT GTCCTTTCTG AATCAAACGT TTGGAATACA
801  GATCCTGATA CAGATGACAG TGTCGGTTGT CTTCAACCACC AATCTTCTCC
851  ACCTGTTGTA CAGGGTTATA TGGCTGAATT TTACCCTCCC TGAGCTTCTA
901  CAGGAATTGA TCTCCGTGAT TTTTGGGATA TTGATCTACG GGTCGCAAAT
951  CTTGTACGTG AATCACGTTT GTGCCAGCAC TAACTCAGAG GCAGTAAATA
1001 TTGGCAACAT TATTTGCGAG TTTTATGAAC CATTGCAAC GAAAGAATTT
1051 CAAGCAGAGA TTCGAGATTT CACTCTACAA TTGATACAAA ATCCAGTGGT
1101 ATTTACGGCA TACGGATTCT TCAATCTGGA TCACTCGTTT ATCCAAGGGG
1151 TTATTGGAAC GATCACCACG TATCTCGTAG TCATGATCCA AGTGGGAGAC
1201 TTATCAAATT CGGACAAATC GATACTCTCA TGA

```

AmGr10: PCR with primers: 415 bps or 362 bps (new seq: 495bps / 442bps)

```

1   atgatagaac tctctaaggc tgacaagata atagaggcgc atcgatcaat
51  taggcattcg acgttacaac agatatggtg gcttcattgt tctctagcga Tm = 60 (F)
101 acgcgaccga aataattaat tccgtgtacg cgatccaatt gttgttttgg
151 atctcgtcta tgcgtttcaa cctgatgtcg aggatttatt cgttgaaagt
201 gttcaaatta tcggattacg ggaagatcag ggaatcaatg ttggtgactg
251 attgcgcgtg gaacctcgta ttgatcacca ccgtgtgcc catgacggct
301 catcaggcga atcgtgtcgg cgagcttatt ttctcacctt actcttcctg
351 ttctctgaaa cgcgtacatt tacaggaaaa tatagaagca gcggcttact
401 ttcaactaag gaaagtacat cttttttaccg ttgctggttt aatacgcgtc Tm = 60 (R)
451 gatcttcttc tctgtctttc gatattctca gcggttaacaa cgtacttggt Tm = 60 (R)
501 gatccttact taa

```

PRIMERS for Obps of *Apis mellifera*

AmObp1: PCR with primers: 337 bps

```

1   atggctagca acacgaagca agccttcacc tattctctcg ccctcctctg Tm = 62 (F)
51  cctccacgcg attttcgtga acgcagcgc ggattgggtg ccgcccagg
101 tgttcgattt ggtcgcggag gacaaggctc ggtgcatgag cgagcacggg
151 acgacgcaag cgcaaatcga cgacgtggac aaagggaaacc tggtaaacga
201 accgtccatc acttgctaca tgtattgctt gttggaggcg ttcagcttgg
251 tggacgatga agcgaacgtg gacgaggata taatgctggg cctgttgccg
301 gatcaacttc aggaaggggc tcagtcggtc atgggcaaat gccttccaac Tm = 62 (R)
351 ctccggctcc gataattgca acaagatata caatctcgcc aaatgcgtcc
401 aagaatctgc accggacgta tgggttcgtta tctaa

```

AmObp2: PCR with primers: 337 bps

```

1   atgaacaccc tcgtcaccgt tacttgtctg ctagccgctc tgaccgttgt
51  acgtggcata gatcaagaca ccgtagtgcg aaagtacatg gagtatttga Tm = 60 (F)
101 tgcccgatat aatgccatgc gccgacgaac ttcacatttc ggaagatatc
151 gcgacgaata tacaagcggc gaaaaatgga gccgatatga gtcaactcgg
201 ttgcttgaaa gcctgcgtga tgaaacgaat agaaatgttg aaaggcacgg
251 aactttatgt agaaccagtg tacaagatga ttgaagtcgt tcatgccggc
301 aacgcggatg atatacaatt agtaaaaggg atcgcgaatg agtgcacgca
351 gaatgccaaa ggggagacgg acgagtgcaa tatcggtaac aaatataccg Tm = 60 (R)
401 actgctacat cgagaaactg ttctcgttaa

```

AmObp3: PCR with primers: 288 bps

[RESULTATS]

```

1  atgaagacca tcgtcatcct acttttcaca ctatgcatcg tctcttatat Tm = 60 (F)
51 gatggttcgt tgtgacgata taacactgtg tttgaaacaa gagaatctta
101 atcttgatga cattgattcc ttgctcgagg atgaaagtga aagaatgctg
151 agaaagcgag ggtgcatcga ggcctgcctt ttccacagat tggctctgat
201 gaacgataac gtcttcgacg tgtcgaaatt cgatgtatat ttaaacgata
251 cagatatgga tatggatctg aaggacagta tacgaaaaat tatacgccaa
301 tgtgtcgata atgctaagaa cgaggataag tgcttgaccg ctcaaaaatt Tm = 60 (R)
351 tagcagatgt gtcatcgatt acgtgaaatt ccatatcacg caatacatga
401 tctcaaacgc aaactcgaac acaacgagcg aagaagagag cagcgacaac
451 tctacttga

```

AmObp4: PCR with primers: 274 bps

```

1  atgaaaatca ccatcgtctc tctcctctgc gtaatatatt gtgcgctggt Tm = 60 (F)
51 tcacgcagac acggtagcaa ttctatgctc gcaaaaagca ggcttcgatc
101 tttccgatct gaaaagcatg tacgaaagta acagcgagga acaaatgaag
151 aagcttggat gtttcgaagc ctgtgtattc caaaagcttc atttcatgga
201 cggtataact ttgaacgtag agaaactcga gtctggaact cgagaactaa
251 caccgcagca ctttacggag gatgtgcacg aaattatcga gcagtgcgtt
301 agcaaagctg cagacgaaga cgaatgcatg gttgcccgaa aatatatcga Tm = 62 (R)
351 ttgcgctttg gaaaaaatga aattccttga tgatgaatta gaaaagattg
401 ctggaaatta a

```

AmObp5: PCR with primers: 310 bps

```

1  atgcacgtaa agtcggtact tttattaata acgatttgtga cgttttgtggc
51 gttaaaaccg gtgaaaagta tgagtgccga tcaggtagaa aaattagcta Tm = 60 (F)
101 aaaatctgcg gaaatcgtgc ttgcaaaaaa tcgcaataac ggaagagttg
151 gtcgacggga tgagaagagg cgaatttccc gatgatcacg atcttcaatg
201 ctacacgacg tgcacatga agttattacg aacttttaaa aatggaaact
251 tcgactttga catgatcgtg aaacaactgg aaatcacgat gccgcctgaa
301 gaggtggtca taggaaagga aatcgtagcg gtatgccgta acgaagaata Tm = 60 (R)
351 taccggcgac gattgccaga aaacgtatca gtacgtgcaa tgccactaca
401 aacagaaccc ggaaaagttt ttcttcccgat ga

```

AmObp6(/8): PCR with primers: 235 bps

```

1  atgaaggggc tcggcgtctc cctgctgggt gcggttgcgc tcgtcctatt
51 agcgatcgag gataccatga gcbaaaagat gacgatcgag gaagcgaaga Tm = 60 (F)
101 aaactatcaa gaatctgagg aaagtttgca gcaagaagaa cgacaccccc
151 aaagagcttc tagacggcca attcaggggc gaattccgcg aggacgagag
201 gctaattgtg tacatgaaat gcatcatgat cgcgactaaa gcgatgaaaa
251 acgacgttat cctgtgggat tttttcgtga agaattgctc catgatattg
301 ctcgaggaat acattccgcg cgttgagagc gtagttgaaa cgtgcaagaa
351 ggaagtgaca tctacggagg gatgcgaggt tgcttggcaa tttggcaagt Tm = 60 (R)
401 gcatctacga aaacgacaag gagctctatt tagcgccatg a

```

AmObp7: PCR with primers: 285 bps

```

1  atgaagaaat ttcttgtgat ttttgtttat atactttccg ttgccgtaat Tm = 60 (F)
51 cattcgagca aatggaataa acgaaatctt gaaaattatg gccgtttcta
101 tgaaagatat acgctactgc ataatacaca tgggcttgac ctttaaggat
151 ttcataaaga tgcaggagct tttgcaagag gaagatatat cggaggggaa
201 tataaaaaaa tatttgacga attacagttg ttccattacg tgcgcttttg
251 aaaaatctca tatcatacag aatgatgaaa ttcagttgga caagttggta Tm = 60 (R)
301 gaaatggcga acagaaaaaa tatatccata gacgtgaaaa tgttaagcga
351 atgcatcaac gcgaacaaaa gtacggacaa atgcgagaac ggattaaact
401 ttataatttg tttttcaaaa ttgttaagcg atatgtatga agatactttt

```

[RESULTATS]

451 gaagatactt taaagcacia aagttacgta taa

AmObp9: PCR with primers: 155 bps

```

1  atgttcaaaa attaccattt ctttttcata ctggttataa ccttaatttt
51  cttgtatttc ggtgaagcgg acattaagaa ggattgccgc aaagagtcca
101  aagtttcatg ggcggcgttg aaaaagatga aagccggaga tatggagcag Tm = 60 (F)
151  gacgaccaa aactgaaatg ctacttgaag tgtttcatga cgaaacatgg
201  tattctggac aagaacgcag aagtggacgt gcaaaaagca cttcggcacc Tm = 62 (R)
251  ttccacgaag catgcaagac tcgacgaaaa aattgttcaa caagtgtaaa
301  tctatccaaa atgaagatcc ttgcgagaaa gcctaccaat tggttaaatg
351  ttacgtggaa tttcatcccg aggttttgca gaccgtccct ttcctttaa

```

AmObp10: PCR with primers: 176 bps

```

1  atgaaatact cgatactggt gagcttatta atcacttgct tgatttgctc
51  accaagtgtt cattgtggga caccgaccgag ttttgtctct gacgagatga
101  tcgcaacagc agccagcgtg gtgaatgctt gccaaacaca gacaggagt Tm = 60 (F)
151  gcaacagtgg atatagaggc agtgaggaaat ggtcaatggc ctgaaacacg
201  tcaattaaag tgtttacatgt actgtttatg ggaacaattt ggattgggtg
251  acgacaagag agaactcagt ttgaacggca tgctcacatt tttccaaaga Tm = 60 (R)
301  ataccagcat acagggctga agttcagaaa gcgatcagcg agtgcaaggg
351  gatcgccaaa ggcgacaact gcgaatacgc gtacagattt aacaaatggt
401  acgcggaatt gtctccacgg acgtattatc tgtttttaa

```

AmObp11: PCR with primers: 356 bps

```

1  atgaaagcag cagaaatttg gctggtatca ttgtactggt atctgatatt
51  gcaaattgct ctcgtttatg gggaaatcag cgatatcgac gaatttagag Tm = 58 (F)
101  aaatgacatc taaatacagg aaaaaatgta tcggtgagac taaaacgaca
151  attgaggatg tcgaagctac ggaatacggg gaatttcctg aagatgagaa
201  attgaaatgt tacttcaact gcgtacttga aaaatttaat gtgatggata
251  agaaaaatgg gaagataaga tataattttac tgaaaaaagt aattccagaa
301  gcattttaaag aaataggtgt agagatgatt gattcttgca gcaatgtcga
351  ttcaagtgac aaatgcgaaa aatcttttat gttcatgaag tgtatgtaccg Tm = 60 (R)
401  aagtcaatcc catagcgttt attgctccgt ga

```

AmObp12: PCR with primers: 174 bps

```

1  atgttatata ataacttaac tattgtaatt atacttatca tgtgtggagt
51  tcaaaattta cgtgcaagaa gcgtcaatat ttttcaagat attgcagact Tm = 60 (F)
101  gcgtggatcg atcaaacatg acatttcatg aattgaagaa acttcgtgac
151  tcgtcggagg caagaataaa attaataaac gaggaggaaa atttcaggaa
201  ctatggctgt ttctagctt gcatttggca acaaaactggc gtgatgaat Tm = 62 (R)
251  gctccgaatt gagcacgtac aacatagcag ggattatcga gggacaatac
301  cacgatgacg aagatcttaa aacgtttttc cataagatcg cgtaaacgtg
351  cgaagatgac gttcacagga agtttttgca cgtgaacgac gagtgtgacg
401  tcgctcttag cttcaaattg tgcattgtga aagctatgcg taattatccc
451  tga

```

[RESULTATS]

AmObp13: PCR with primers: 206 bps

```

1  atgaagacga ttatTTTTtTat ctttgccttt tgccctcggtg gtattctggc Tm = 62 (F)
51 agtttctgaa gaatcaataa ataagctacg taaaatagag tcagtttgcg
101 ccgaagaaaa tggatttgac ctaaagaaaag cagacgacgt taagaagggt
151 attttgcgata aaaatgatga aaaattggct tgttacgttg attgcatgct
201 gaaaaaagtt ggatttgtta acgcagacac aactttcaac gaagaaaaat Tm = 60 (R)
251 tcagagaaaag gacaacgaaa ttagacagtg aacagggtcaa tcgattagtc
301 aacaattgta aagatatcac tgaatccaat tcgtgtaaga aatctagtaa
351 attactgcaa tgtttcatag acaacaatct gatgaagata tttgaataa

```

AmObp14: PCR with primers: 286 bps

```

1  atgaaaacta tcgtgcttat tttcggccttt tgcgtttgcg ttggtgctct Tm = 62 (F)
51 gacaaatcgaa gaattaaaaa ctagattgca tactgagcaa tcagtttgca
101 aacagaaaac tggcattgat cagcaaaaag caaatgacgt tattgaaggc
151 aatatcgatg tagaagataa aaaagttcaa ttgtactgtg aatgtatatt
201 aaaaaatttc aacattcttg acaaaaacaa tgtctttaaa ccacaaggaa
251 tcaaagcagt catggaatta cttatagacg agaattctgt taaacaatta ta
301 gtctccgatt gttcaacca ctctgaagaa aatccacatt tgaaagcaag Tm = 60 (R)
351 taagttagta cagtgtgttt cgaaatataa aacgatgaaa tcagtagatt
401 ttctctaa

```

AmObp15: PCR with primers: 319 bps

```

1  atgaaaacga ttttgattat ttttgctatt tgcaatttgcg ttggcgcatt Tm = 60 (F)
51 gtcgatcaaa gattttcaaa atgcgatacg tatgggacaa tcaatttgca
101 tggcaaaaac tggcattaat aacaaaataa taaatgatgt taatgatggc
151 aaaatcaata tagaggacga aaatggtcaa ttatacattg aatgtgcgat
201 gaaaaaattc agtttcgttg acaaggatgg aaatttcaac gaacacgtat
251 ccagagaaat agcaaaaaata tttttaaacg aaaatgaaat taatcaatta
301 atcacgcaat gttcagctat ctctgatacc aatgtacatt taaaaattac Tm = 60 (R)
351 taagatatatt cagtgtatta cgaaatttaa aacaataaat gatatatataa
401 attcctaa

```

AmObp16: PCR with primers: 239 bps

```

1  atgaaaacgt tcgtgattat ttttgctatt tgcgtttgcg ttggtgcaat Tm = 60 (F)
51 gacacatgag gaattaaaaa ccggaataca gactttacag ccaatttgcg
101 taggcgaaac tggcactagt caaaaataa tagatgaagt ttataatggc
151 aacgtcaatg tagaagacga aaatggtcaa tcatacgttg aatgtatgat
201 gaaaaaattt aatggtgttg acgagaatgg aaatttcaat gaaaaaata
251 ccagagatat tgtgcaagca gttttagacg ataatgaaac tgatcaacta Tm = 62 (R)
301 attgtcgaat gttcacctat ctctgatgcc aatgtacaca taaaaatttc
351 taagatatatt cagtgtttta tgaaatataa aacaataact gatatatataa
401 attcctaa

```

AmObp17: PCR with primers: 325 bps

```

1  atgaaaacga tcgtaatttat ttctgctatt tgcgtttgcg ttagtgcaat Tm = 60 (F)
51 gacacttgac gaattaaaaa ccggactaca tactgtgcag tcagtttgca
101 tgaaagaaat tggcactgct caacaaataa tagatgacat taatgagggc
151 aagatcaata tggacgacga aaatgtttta ttattcattg aatgtacgat
201 gaaaaaattc aatggtgttg atgagaatgc aaatttcaat gaaaaaattt
251 ctacgcatat tgtgagagca gttttaaacg ataatgaagc tgatcaatta
301 cttgccgaat gttcacctat ttctgatccc aatgcactta taaaaattag Tm = 60 (R)
351 taagatatata gagtgtcttt ttaaataata aacaataaat cagatactaa
401 attcctaa

```


[RESULTATS]

AmObp18: PCR with primers: 278 bps

```

1   atgaaaacgt ttgtgattat ttctgctatt tgcgtttgcg ttggtgcatt
51  gacacttgaa gaatttcaaa tcgggctacg tgctgtggtg ccaatttgca Tm = 60 (F)
101 ggatagaaac tagcattgat caacaaaaag aagatgattt tcgtgacggc
151 aacattgatg tagaagatga gaaagttcaa ttgttttctg aatgtttaat
201 aaaaaagttc aatggctatg acgatggtgg aaattttaac gaagttgtga
251 tcagagagat agcggaaata tttttagatg aaaatggagt taataaatta
301 atcaccgaat gttcggctat ctctgatgct gacttagctg taaaatctgc Tm = 60 (R)
351 taaattattg aagtgtattg gaaaatataa aacattgaaa gaaatgttaa
401 gtggctaa

```

AmObp19: PCR with primers: 367 bps

```

1   atgaaaacta tcgtggttat ttttgccttt tgcattttgcg ttaatgcaat Tm = 60 (F)
51  gacaattgaa gaattgaaaa tccaattacg tgatgtgcag gaaatttgca
101 aggcagaatc tggcattgat cagcaaacag tagatgacat taatgaagtg
151 aatttcgatg tagaagatga gaaacctcaa cgctacaatg aatgcatact
201 aaaacaattc aatattgttg atgagagtgg aaactttaag gaaaatatcg
251 ttcaagaact aacgagtata tatttagatg aaaatgtaat taagaaatta
301 gtcgccgaat gttcggttat ctctgatgcc aatatatata taagatttaa
351 taaaactagt aagtgttttg gaaaatataa aacaatgaaa gaagtattaa Tm = 58 (R)
401 atctctaa

```

AmObp20: PCR with primers: 225 bps

```

1   atgaaaacta tcgtggttat ttttgccttt tgcattttgcg ttaatgcaat Tm = 62 (F)
51  gacaattgaa gaattgaaaa tccaattaca tgatgtgcag gaaatttgca
101 agacagaatc tggcattgat cagcaaacag tagatgacat taatgaagtg
151 aacttcgatg tagaagatga gaaacctcaa cgctacaatg aatgcatact
201 aaaacaattc aataattgtt atgagagtgg aaactttaag gaaaatatcg Tm = 60 (R)
251 ttcaagaact aacgagtata tatttagatg aaaatgtaat taagaaatta
301 gtcgccgaat gttcggttat ctctgatgcc aatatatata taagatttaa
351 taaactagtg aagtgttttg gaaaatataa aacaatgaaa gaagtattaa
401 atctctaaat attcaattat taaaagaaaa agagatttat ttataataca
451 atatatTTTT taactttgat tatactTTTT aactttgaaa atatttaaaa
501 aattatatca ataaattaat atacgattac tta

```

AmObp21: PCR with primers: 216 bps

```

1   atgaaaacga tcgtgattat ttctgctatt tgcgtttgcg ttggtgcatt Tm = 60 (F)
51  gacacttgaa gaattacaaa ttgggctacg tgctgtgata ccagtttgta
101 ggatagatag tggcattgat gaaaaaaaag aagatgattt tcgtaacggc
151 atcattgatg tagaaaatga gaaagttcaa ttgttttctg aatgtttaat
201 aaaaaaattc aatgcttatg acgatggtgg aaattttaac gaagttgttg Tm = 60 (R)
251 tcagagaaat agcggaaata tatttagatg aaaatgaagt taataaatta
301 atcaccgaat gttcggctat ctctgatgct gacatacatt tgaaatctag
351 taaattaata aagtgttttg caaaatataa aacattgaaa gaaataatga
401 atgagtaa

```

[RESULTS]

Text S1. Transcript analysis and PCR strategies to determine gene expression in the wing. Genes were retrieved from the NCBI genomes for *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* and *Acyrtosiphon pisum*. The forward (F) and reverse (R) primers are in blue. The red marks indicate the location of introns. L. G. is the length of the genomic sequence and L. cDNA is the length of the cDNA sequence.

Figure S1

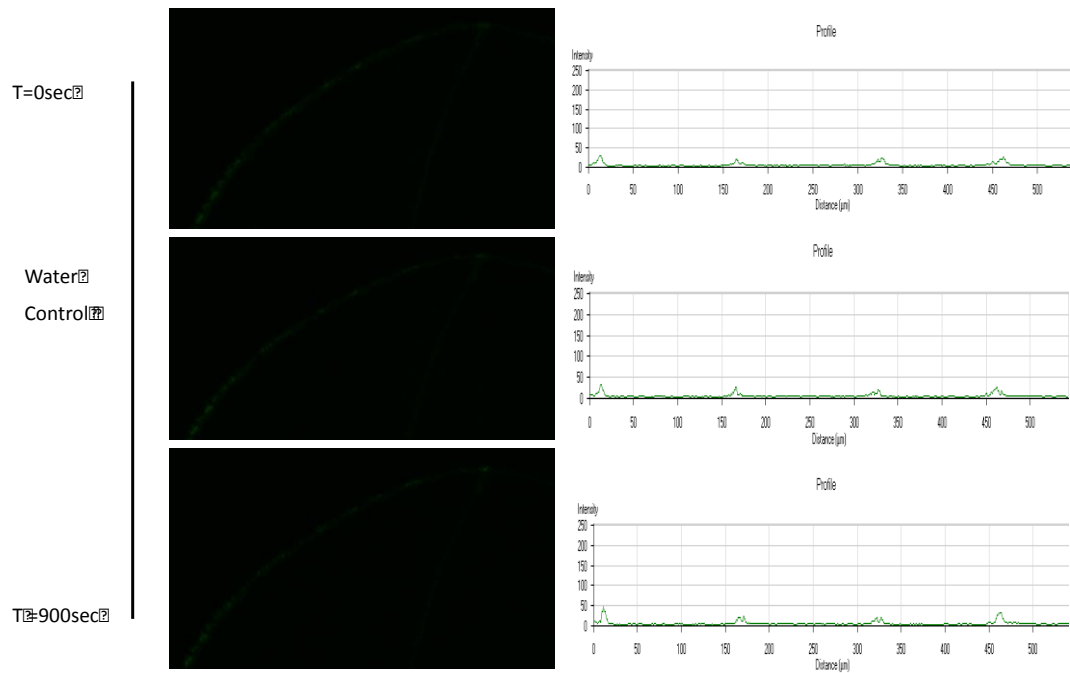


Figure S1. Control of the calcium sensor expressed in adult *Drosophila* wings.

Fluorescence was measured in UAS-GCaMP wings carrying the *tub*-GAL4 driver and put in contact with water. Only a very faint background signal in the wing anterior margin is observed.

Figure S2

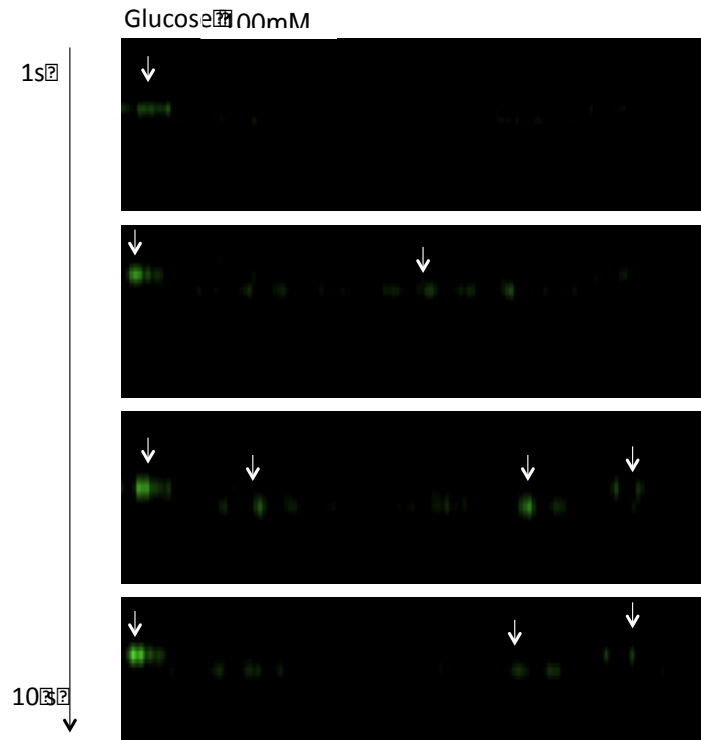


Figure S2. Kinetics of calcium imaging in *Drosophila* adult wings after glucose stimulation.

For this experiment, the individual flashes of light seem randomly distributed in the gustatory sensilla alignment. See figure S3 for measurement of fluorescence and the Methods section for details.

Figure S3

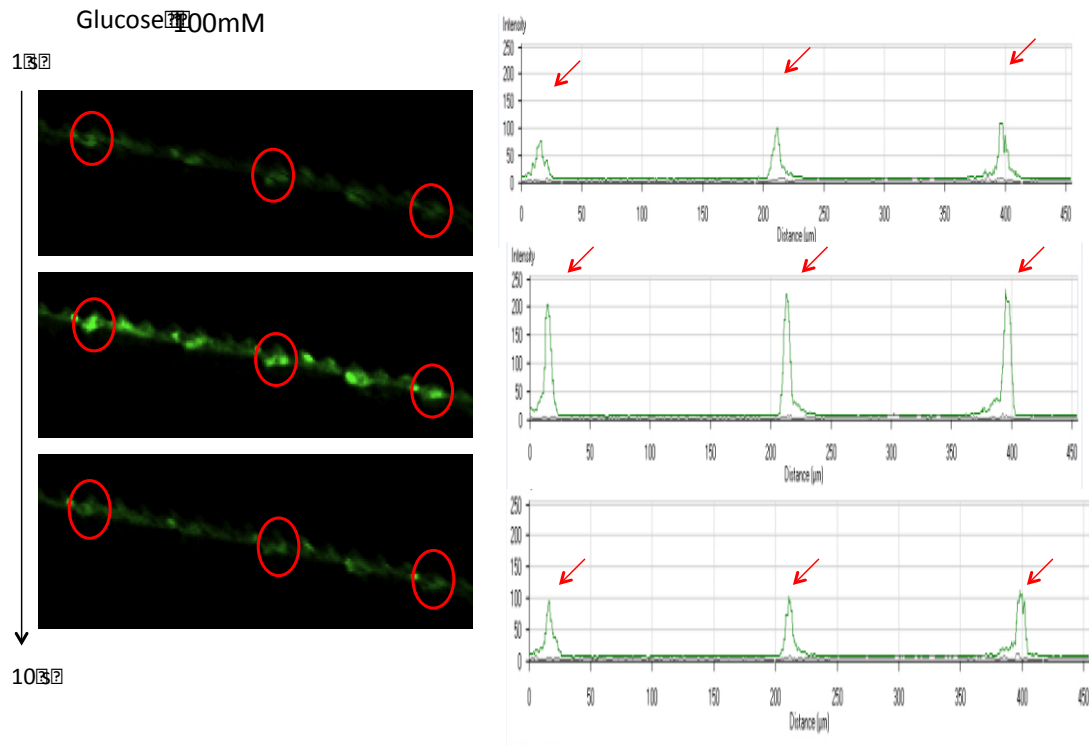


Figure S3. Fluorescence in the wing margin nerve after glucose treatment.

The intensity of light is quantified in individual spots (red circles) in a sequential mode (from $t = 0$ s to $t = 10$ s) during the confocal microscopy recording.

Figure S4

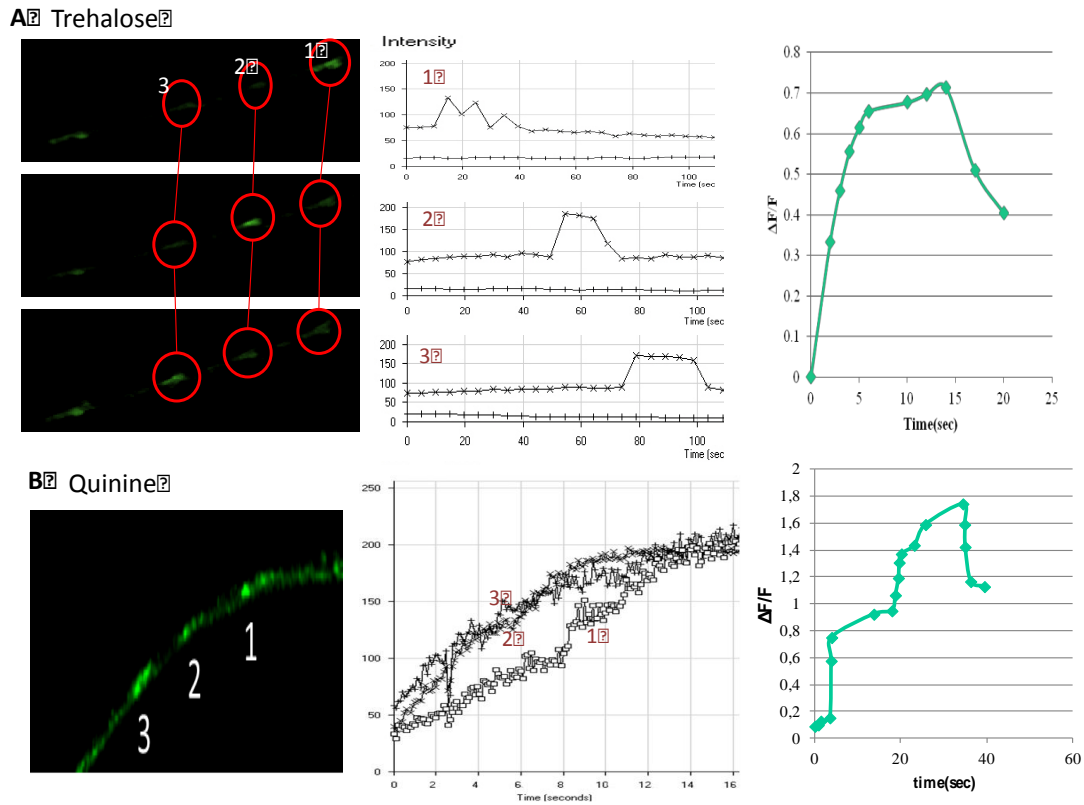


Figure S4. Kinetics of calcium imaging in the *Drosophila* adult wing after trehalose or quinine stimulation.

(A) Fluorescent changes in responses to 100 mM trehalose. In this specific trehalose experiment, we observed the synchrony of the flash of light from one gustatory cell to the next in a sequential mode (1, 2 and 3 correspond to three such cells). (B) Kinetics of calcium imaging in the *Drosophila* adult wing after 100mM quinine treatment. Corresponding $\Delta F/F$ are shown on the right.

Figure S5

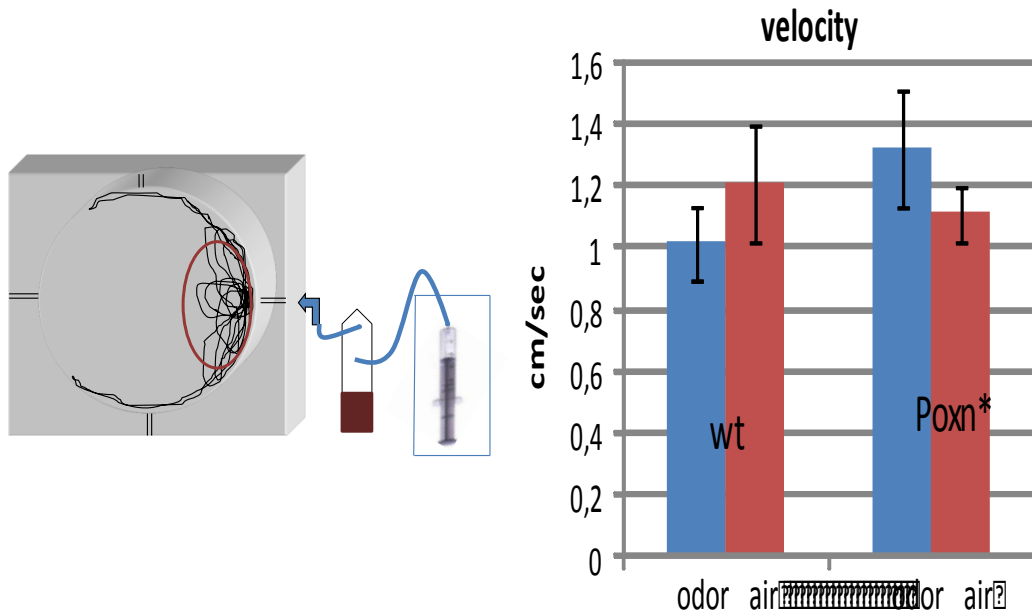


Figure S5. Control of the velocity of the wild-type and *poxn strains.**

The corresponding behavioral data are shown in figure 6. A trajectometry study using a camera connected to a Noldus Ethovision software allowed us to calculate the speed (cm/s) of individual flies in their active state. 15 experiments were conducted and bars represent the mean \pm sem. Non parametric statistics (*Tukey*) indicates no significant differences ($p > 0.05$) between odor (blue) and air (red) for both genotypes.

Figure S6

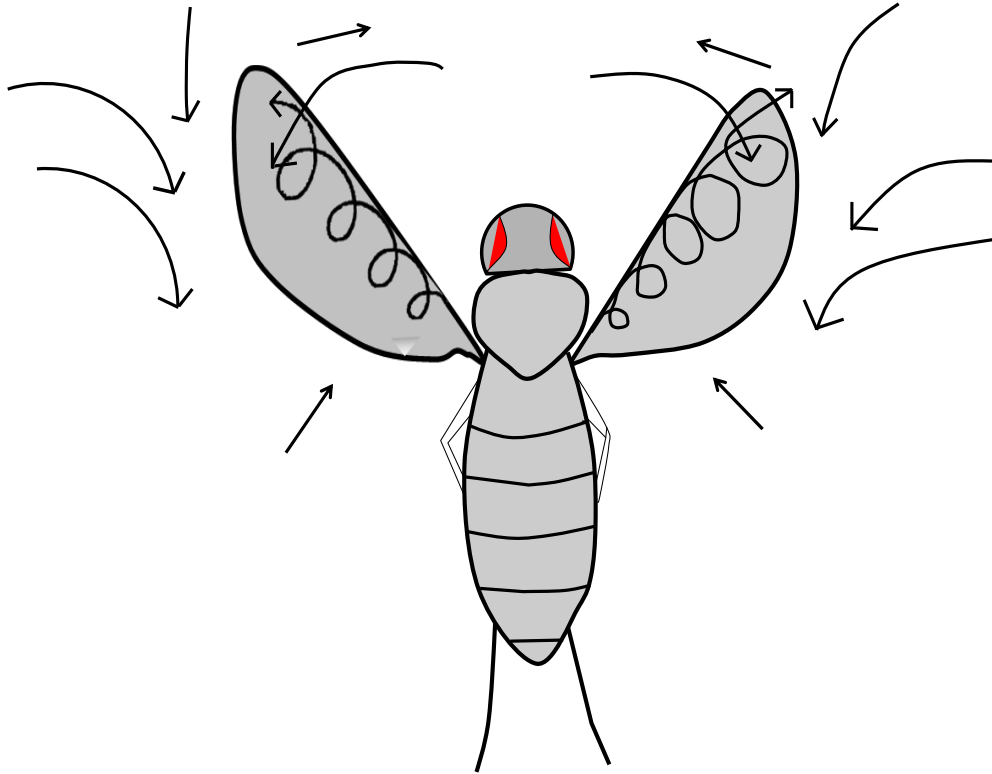


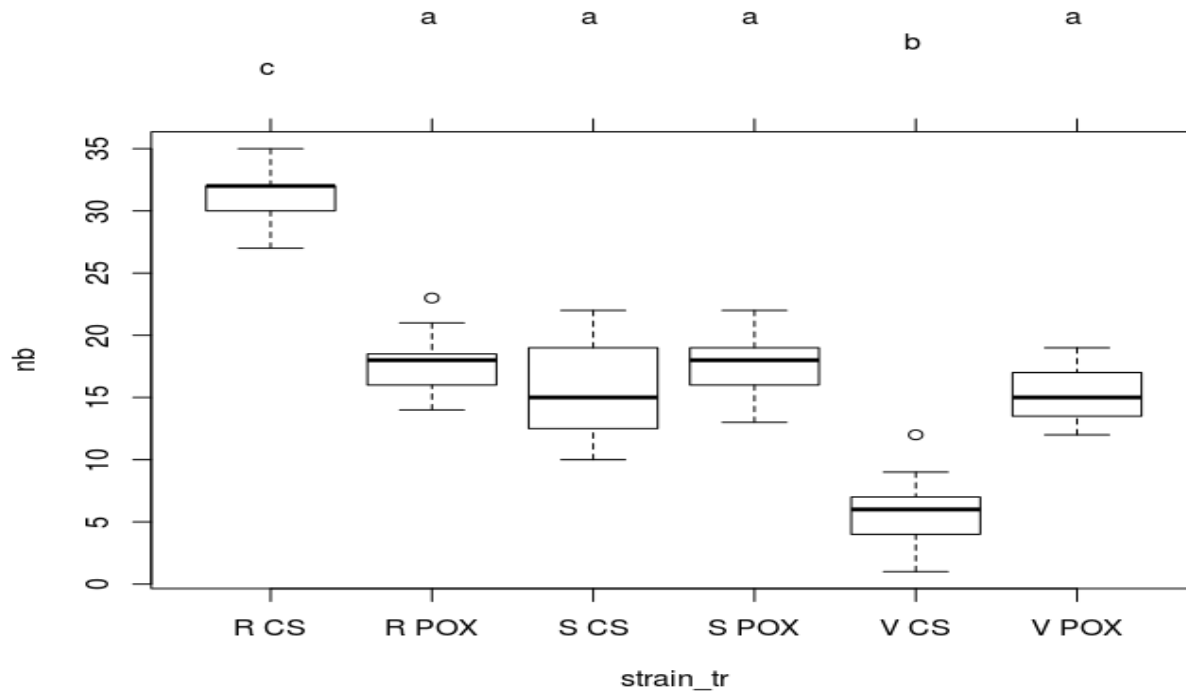
Figure S6. Graphic representation to illustrate the “leading edge vortex”.

The wing beat creates turbulence with high pressure behind the wing and low pressure in front so that a air vortex is created and is siphoned off along the anterior wing margin, where chemosensory and mechanosensory receptors are located.

[RESULTATS]

Figure S7: statistical analysis of the data presented in the main text

(A) Bayesian conditioning



Estimate Std.Error z value Pr(>|z|)

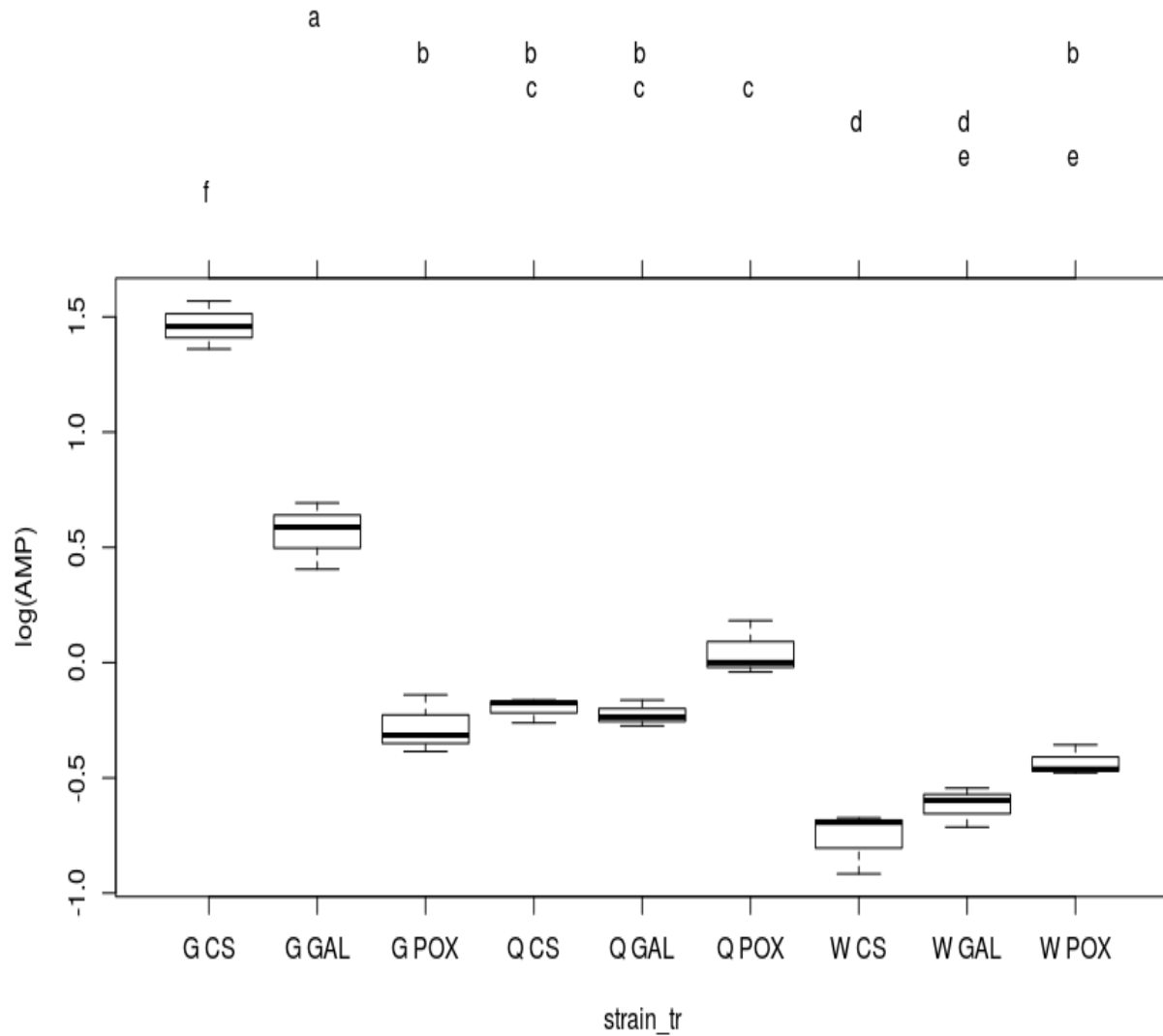
```
# R POX - R CS == 0 -0.56924 0.07673 -7.419 <0.001 ***
# S CS - R CS == 0 -0.69315 0.07989 -8.676 <0.001 ***
# S POX - R CS == 0 -0.58058 0.07701 -7.539 <0.001 ***
# V CS - R CS == 0 -1.71008 0.11786 -14.509 <0.001 ***
# V POX - R CS == 0 -0.74109 0.08119 -9.128 <0.001 ***
# S CS - R POX == 0 -0.12391 0.08952 -1.384 0.729
# S POX - R POX == 0 -0.01134 0.08696 -0.130 1.000
# V CS - R POX == 0 -1.14085 0.12459 -9.156 <0.001 ***
# V POX - R POX == 0 -0.17185 0.09068 -1.895 0.395
# S POX - S CS == 0 0.11257 0.08976 1.254 0.803
# V CS - S CS == 0 -1.01693 0.12657 -8.035 <0.001 ***
# V POX - S CS == 0 -0.04794 0.09338 -0.513 0.995
# V CS - S POX == 0 -1.12950 0.12477 -9.053 <0.001 ***
# V POX - S POX == 0 -0.16051 0.09092 -1.765 0.478
# V POX - V CS == 0 0.96899 0.12739 7.606 <0.001 ***
```

Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

R CS/POX: +grape juice; S CS/POX: +sugar; V CS/POX: +fermented grape juice

[RESULTATS]

(B) Test of [cAMP] after treatment with glucose or quinine or water



Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)

```
# G GAL - G CS == 0 -0.90060 0.08533 -10.554 < 0.001 ***
# G POX - G CS == 0 -1.74261 0.08533 -20.421 < 0.001 ***
# Q CS - G CS == 0 -1.66215 0.08533 -19.478 < 0.001 ***
# Q GAL - G CS == 0 -1.68696 0.08533 -19.769 < 0.001 ***
# Q POX - G CS == 0 -1.41557 0.08533 -16.589 < 0.001 ***
# W CS - G CS == 0 -2.22366 0.08533 -26.058 < 0.001 ***
# W GAL - G CS == 0 -2.08137 0.08533 -24.391 < 0.001 ***
```

[RESULTATS]

W POX - G CS == 0 -1.89498 0.08533 -22.207 < 0.001 ***
G POX - G GAL == 0 -0.84201 0.08533 -9.867 < 0.001 ***
Q CS - G GAL == 0 -0.76155 0.08533 -8.924 < 0.001 ***
Q GAL - G GAL == 0 -0.78636 0.08533 -9.215 < 0.001 ***
Q POX - G GAL == 0 -0.51497 0.08533 -6.035 < 0.001 ***
W CS - G GAL == 0 -1.32306 0.08533 -15.504 < 0.001 ***
W GAL - G GAL == 0 -1.18077 0.08533 -13.837 < 0.001 ***
W POX - G GAL == 0 -0.99438 0.08533 -11.653 < 0.001 ***
Q CS - G POX == 0 0.08047 0.08533 0.943 0.98676
Q GAL - G POX == 0 0.05565 0.08533 0.652 0.99887
Q POX - G POX == 0 0.32704 0.08533 3.833 0.02594 *
W CS - G POX == 0 -0.48105 0.08533 -5.637 < 0.001 ***
W GAL - G POX == 0 -0.33876 0.08533 -3.970 0.01979 *
W POX - G POX == 0 -0.15237 0.08533 -1.786 0.69020
Q GAL - Q CS == 0 -0.02481 0.08533 -0.291 1.00000
Q POX - Q CS == 0 0.24658 0.08533 2.890 0.15643
W CS - Q CS == 0 -0.56152 0.08533 -6.580 < 0.001 ***
W GAL - Q CS == 0 -0.41923 0.08533 -4.913 0.00288 **
W POX - Q CS == 0 -0.23284 0.08533 -2.729 0.20521
Q POX - Q GAL == 0 0.27139 0.08533 3.180 0.09286 .
W CS - Q GAL == 0 -0.53670 0.08533 -6.289 < 0.001 ***
W GAL - Q GAL == 0 -0.39441 0.08533 -4.622 0.00519 **
W POX - Q GAL == 0 -0.20802 0.08533 -2.438 0.32183
W CS - Q POX == 0 -0.80809 0.08533 -9.470 < 0.001 ***
W GAL - Q POX == 0 -0.66580 0.08533 -7.802 < 0.001 ***
W POX - Q POX == 0 -0.47942 0.08533 -5.618 < 0.001 ***
W GAL - W CS == 0 0.14229 0.08533 1.667 0.75731
W POX - W CS == 0 0.32868 0.08533 3.852 0.02495 *
W POX - W GAL == 0 0.18639 0.08533 2.184 0.45437

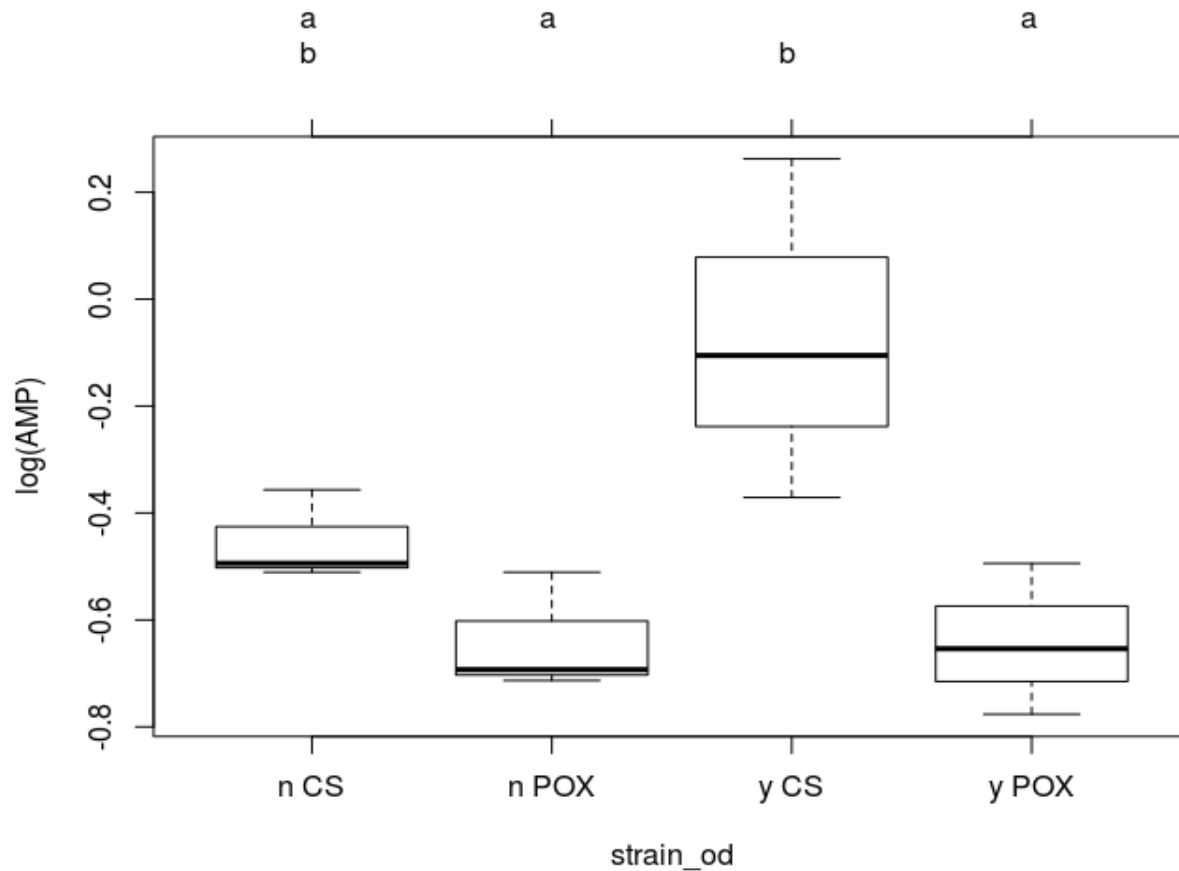
Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

GAL : 6791 (GAL4-wing)

G CS/POX/GAL: +glucose; Q CS/POX/GAL: +quinine; W CS/POX/GAL: +water

[RESULTATS]

(C) Test of [cAMP] after exposure to grape juice odor



Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)

```
# n POX - n CS == 0 -0.185175 0.153194 -1.209 0.6387
# y CS - n CS == 0 0.382579 0.153194 2.497 0.1349
# y POX - n CS == 0 -0.187652 0.153194 -1.225 0.6298
# y CS - n POX == 0 0.567754 0.153194 3.706 0.0248 *
# y POX - n POX == 0 -0.002476 0.153194 -0.016 1.0000
# y POX - y CS == 0 -0.570231 0.153194 -3.722 0.0242 *
```

Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

n CS/POX : no odors (control) y CS/POX : + odors

Figure S7. Statistical representation of the cAMP dosage and behavioral experiments. (A) Comparaison the accumulation (attraction to fresh juice) of the CS strain and the Pox strain after exposure to fresh or old grape juice. (B) Comparaison of the [cAMP] after treatment of three strains (CS, Pox, Gal) with three different compounds (Glucose, Quinin, Water). (C) Comparaison of the [cAMP] between the CS strain

[RESULTS]

and the POX strain after treatment with grape juice odor. A non parametric test (Tukey) was used to determine the degree of significance. Box-plots with the same letter show means that are not significantly different.

Movie S1

Effect of glucose on the calcium signaling monitored by a calcium sensor GCaMP expressed in *Drosophila* wing neurons. See Methods section for more details. The flashes of light are observed in sequential mode or alternatively a luminous spot can disappear and then re-emerge.

Movie S2

Effect of denatonium signaling monitored by a GCaMP calcium sensor expressed in *Drosophila* wing neurons. See Methods section for more details. The flashes of light seem biphasic with strong immediate effect following the stimulation. The slow return to baseline might be accountable to a high affinity between GCaMP and calcium in the context of the wing gustatory organs.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. Résultats test de comportement (trajectométrie)

Distance parcourue. C'est la distance parcourue par la drosophile dans l'arène expérimentale pendant 5 min sans stimuli.

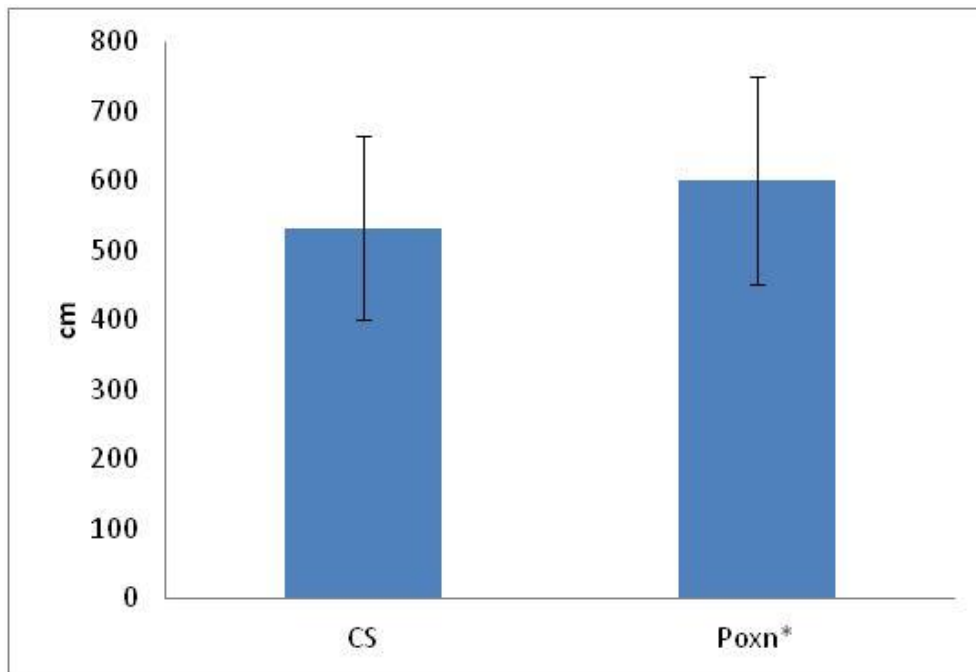


Figure 26. Représentation graphique de la distance parcourue par les deux souches de drosophile (femelles CS et Poxn*). Il n'y a pas de différence significative. T test de Wilcoxon - Mann - Whitney ($\alpha = 0.05$). Pour chaque génotype, $n=15$

[RESULTATS]

Distance moyenne des drosophiles dans l'arène par rapport à l'entrée des odeurs. C'est la moyenne des distances qui séparent les drosophiles (femelles) du point d'entrée des odeurs à chaque instant (1/4000) de l'expérience.

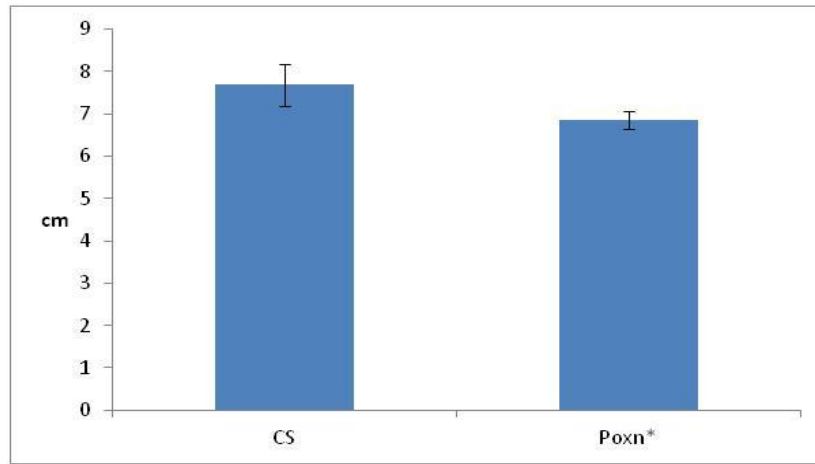


Figure 27. Représentation graphique de la moyenne des distances entre le corps de la drosophile et l'entrée des odeurs pour les deux souches considérées (femelles CS et Poxn*). Il n'y a pas de différence significative. Test de test de Wilcoxon - Mann - Whitney ($\alpha = 0.05$). Pour chaque génotype, $n=15$.

Temps passé dans la zone I. C'est le temps passé dans la zone d'entrée d'odeur désigné en pointillé dans la figure 23.

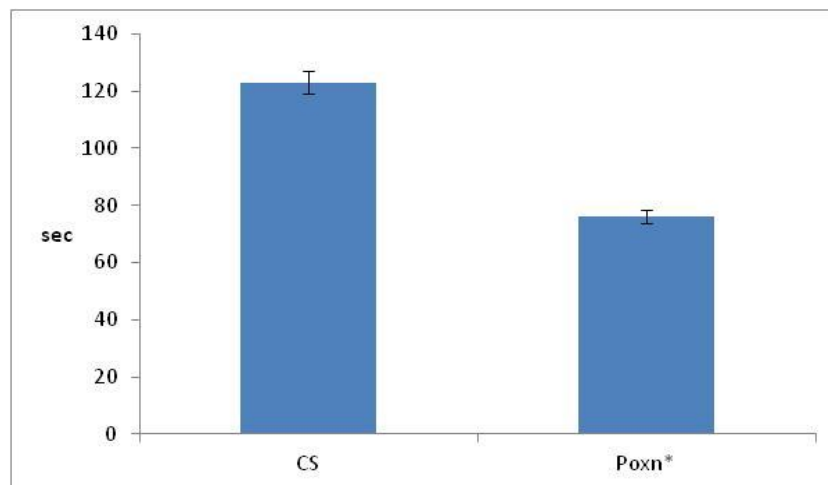


Figure 28. Représentation graphique du temps passé dans la zone I par les deux souches de drosophile (femelle CS et Poxn*). Il y a une différence significative. Test de Wilcoxon - Mann - Whitney ($p < 0.05$). Pour chaque génotype, $n=15$.

[RESULTATS]

Vélocité. C'est la vitesse moyenne des trajectoires de la drosophile à l'exclusion des poses immobiles.

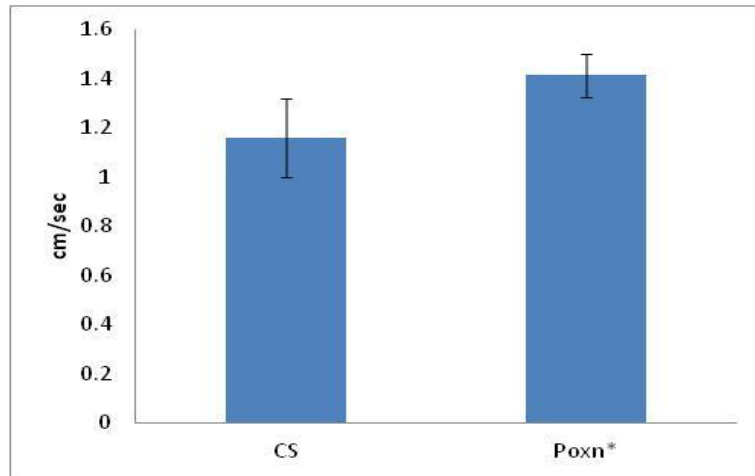


Figure 29. Représentation graphique de l'activité locomotrice des deux souches de drosophile (femelles CS et Poxn*). Il n'y a pas de différence significative. Test de Wilcoxon - Mann - Whitney ($\alpha = 0.05$). Pour chaque génotype, $n=15$.

Mobilité/immobilité. C'est le temps que la drosophile passe en mobilité par rapport au temps total de l'expérience.

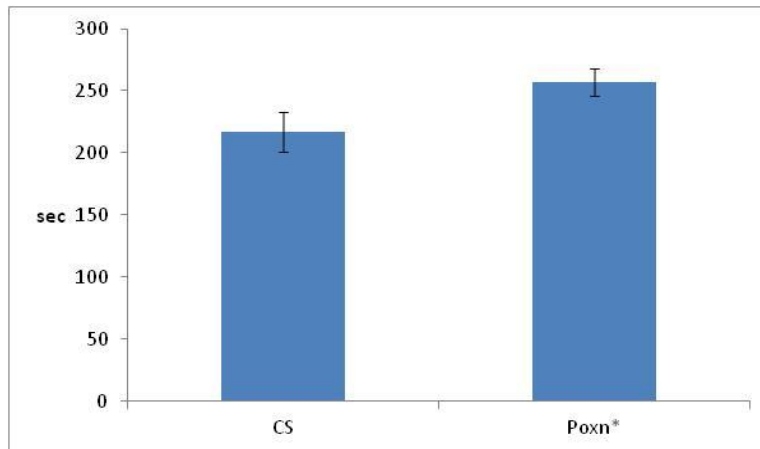


Figure 30. Représentation graphique de la mobilité des deux souches de drosophile (femelle CS et Poxn*). Il y a une différence significative Test de Wilcoxon - Mann - Whitney ($p < 0.05$). Pour chaque génotype, $n=15$.

[RESULTATS]

Les effets que pourrait engendrer la transformation des cellules chimio-sensorielles de la bordure de l'aile en cellules mécano-sensorielles ont été appréhendés par des études comportementales mettant en jeu nos techniques de trajectométrie par caméra suivie de la déconstruction analytique des trajectoires assistées par un logiciel Noldus. Cette technique a la capacité de tester de multiples paramètres durant l'expérience tels vitesses angulaire et linéaire, temps de pause, distance parcourue et densité de présence dans des zones pré dessinées de l'arène.

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative pour la distance parcourue entre la souche CS et le Poxn* pas plus que la distance moyenne de l'insecte par rapport au trou d'entrée des odeurs au cours de l'expérience. Par contre, le mutant Poxn* montre une mobilité plus importante que celle de la souche CS avec une différence significative (temps additionné des pauses plus court). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, la souche CS est moins active que le mutant Poxn*. L'état plus actif du Poxn* peut être due à la perturbation d'orientation suite à des stimuli olfactifs.

Le paramètre le plus parlant dans cette expérience est le temps passé dans la zone d'entrée d'odeur. Ce résultat montre une différence significative avec 123 secondes par expérience passées par la souche CS dans cette zone, comparé à 76 sec pour le Poxn*. Ces résultats montrent que la souche sauvage CS a une attirance pour la zone d'entrée des odeurs plus importante que celle du Poxn*. La plus faible attirance de Poxn* peut être expliquée par la perturbation des systèmes chimio-sensoriels de l'aile.

2. Test de toxicité

Les différentes souches ont également été testées quant à l'éventualité de la toxicité générée par les émanations des sources d'odeur tel le jus de raisin vieux et fermenté.

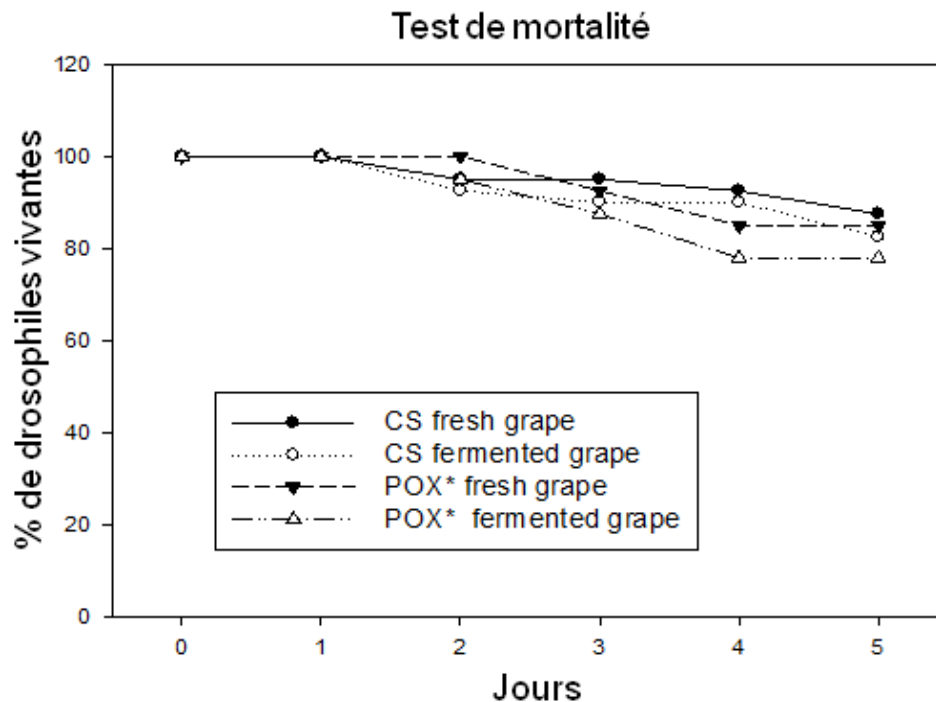


Figure 31. Représentation graphique de la vitalité des mouches exposées aux stimuli olfactifs en fonction du temps.

Les résultats montrent un pourcentage de mortalité de 12% pour les drosophiles sauvages exposées au jus de raisin frais comparé à 17% pour celles exposées au vieux jus de raisin (fermenté). Pour le mutant Poxn* le taux de mortalité est de 15% après exposition au jus de raisin frais et de 20% après exposition au vieux jus. D'après ces résultats on peut conclure qu'un effet toxique de vieux jus de raisin est négligeable.

3. Test de pulvérisation



Figure 32. *Photos prises durant l'expérience de pulvérisation. (Haut à gauche) Drosophile en l'état statique collé au niveau de l'arrière de la tête à un fil métallique. On note que les ailes sont immobiles. (Haut à droite) La même drosophile vibre les ailes et ainsi reproduit le vol. (Bas à gauche) petit tas de talc. (Bas à droite) Photo du talc représenté à gauche après exposition du vol statique de la drosophile à une courte distance (quelques millimètres). La zone entourée par une ligne marron représente la région où on observe une dispersion de la poudre.*

Malgré sa simplicité et son empirisme, cette expérience montre l'effet pulvérisant du vol de la drosophile sur des microparticules fines et légères. Les battements des ailes avec une grande fréquence (200-2000 Hz) créent une turbulence/vortex dont les conséquences seraient la nébulisation/ mise en suspension de particules très fines.

Cette expérience accompagnée des multiples données aérodynamiques (Dickinson et al., 1999; Sane, 2003) (Sanjay. 2003; Deckinson et al, 1999) sur le vol des insectes, nous permet de renforcer notre hypothèse d'un pouvoir pulvérisant lié à l'action vibratoire des ailes des insectes.

DISCUSSION

[DISCUSSION]

Mes travaux ont consisté à analyser la fonction des récepteurs gustatifs présents sur la bordure antérieure de l'aile des insectes. Grâce au modèle drosophile pour lequel les outils génétiques sont puissants, nous avons montré que ces récepteurs sont fonctionnels et répondent aux sucres et aux molécules amères. La présence de structure neuronale du goût dans l'aile reste énigmatique et peu étudiée en absence d'hypothèses pertinentes pour expliquer ces choix évolutifs depuis que les insectes ont conquis la terre et les airs à partir d'organismes primitifs marins.

La structure neuronale de la bordure antérieure de l'aile alterne des sensilles gustatives et mécano-sensorielles. Les axones des deux entités sont assemblés en un nerf unique qui se projette vers les ganglions thoraciques. Ces deux modalités sensorielles qui associent dans le même nerf des informations mécaniques et chimiques forment un système neuro anatomique où l'activité des deux types de sensilles pourrait mutuellement s'influencer.

La présence intrigante des cellules gustatives sur les ailes des insectes met en lumière la pression de sélection qui s'est exercée durant des millions d'années pour assurer le succès évolutif de ces structures neuro-anatomiques. Les organismes marins ancestraux par lesquels les insectes ont évolué de toute évidence possédaient sur leurs pattes des cellules chimio-sensorielles de type gustatif qui leur permettaient de se guider dans un environnement aqueux. Ce système ancestral associerait donc le déplacement mécanique et la détection chimique de façon synchrone par un arc réflexe simple. L'hypothèse est corroborée par les expériences de grenouille décérébrée qui conserve le réflexe de grattage unilatéral ou bilatérale suite à une stimulation cutanée sur une patte par le dépôt d'une micro goutte d'acide acétique.

Les insectes ont donc conservé ces éléments anatomiques mais subsiste la brûlante question du pourquoi des cellules olfactives qui n'ont pas été sélectionnées par l'évolution à la place des cellules gustatives. L'idée que nous avons poursuivi est que les systèmes gustatif et olfactif sont beaucoup moins dissociés chez les insectes au regard de leurs fonctions comparées aux mammifères, des ligands volatiles pouvant activer les récepteurs gustatifs tel que la littérature l'a déjà rapporté (Dethier, 1972) (Dethier 1972). De plus, les OBPs, en fixant des molécules volatiles durant le vol, pourraient modifier leur conformation et activer secondairement les récepteurs gustatifs. Plus intrigant encore, beaucoup de récepteurs gustatifs chez la drosophile sont exprimés dans des structures non gustatives tels l'organe de Johnston (l'équivalent du système auditif chez les mammifères) et dans l'abdomen. Ceci pose la question

[DISCUSSION]

de ligands endogènes libérés dans l'hémolymph des sensilles suite aux vibrations de l'aile et qui pourraient activer secondairement les récepteurs gustatifs de l'aile.

Nos travaux montrent pour la première fois que ces entités gustatives sont fonctionnelles et répondent aux sucres et aux molécules amères. Par ailleurs, des experts en aérodynamique du vol des insectes proposent la création d'un vortex qui s'échappe en spirale le long de la bordure antérieure de l'aile. Nous constatons la parfaite superposition entre ce vortex et le nerf costal de l'aile. Nous en déduisons que les vibrations de l'aile entre 50 et 2.000 Hertz chez les insectes sont en mesure de nébuliser des matériaux (micro poussières, micro gouttelettes, molécules faiblement volatiles) lesquels vont être captés/entraînés dans le vortex et adressés aux sensilles gustatives. Ce mécanisme peut être placé dans un contexte de parade dans lequel les vibrations des ailes au moment de la danse nuptiale permettent d'émettre des signaux sonores conjointement à des molécules sapides et/ou phéromonales. Cette hypothèse n'a pas été testée dans ce travail par contre elle mériterait une étude détaillée ultérieurement.

Notre hypothèse est que ce mécanisme permettrait aux insectes pollinisateurs de goûter les fleurs sans se poser et sans mettre à contribution la trompe et donc de dissocier le goût de l'ingestion digestive en évitant les empoisonnements.

Nous avons montré également que des molécules volatiles peuvent activer le système neurosensoriel de l'aile grâce à des outils d'inactivation d'un gène spécifique exprimé dans les cellules chimio-sensorielles corroborant l'hypothèse d'un guidage du vol par certains odorants. Cependant, l'idée que les vibrations de l'aile des insectes pollinisateurs nébulisent des microgouttelettes capturées ensuite dans le vortex suppose des expériences de physique. La démonstration de ces hypothèses nécessite de filmer et voir des objets de très faible dimensions à l'aide d'une caméra ultrasensible afin de décomposer les cinétiques. Nous notons que ce faisceau d'expérience est un pari technologique difficile, mais nécessaire.

Par ailleurs, nous avons observé de façon inconstante mais significative qu'une élévation drastique du calcium dans les sensilles gustatives de l'aile, est suivi d'une élévation modérée de calcium dans les sensilles mécano-réceptrices. Notre hypothèse est qu'une communication entre les deux systèmes opère et que les deux modalités sensorielles s'influencent mutuellement. Ceci corrobore l'hypothèse que le nerf costal unique composé d'axones provenant de deux types de cellules sensorielles (les mécaniques et chimiques abritées dans des sensilles distinctes, alternées et/ou organisées en trois rangées) constitue un système de coïncidence. Le codage de

[DISCUSSION]

l'information spatiale et temporelle doit par principe répondre aux exigences suivantes pour être opérant: 1) une stimulation chimique intense ne doit pas durer au risque de saturer le système; 2) les turbulences atmosphériques et la vitesse du vol doivent être perçues de façon immédiate et reflexe pour guider le vol; 3) les informations des deux types sensoriels doivent être intégrées en simultanéité pour réaliser l'exploration de la niche écologique.

A ce jour, les mécanismes de communication entre les deux systèmes sensoriels intégrés en un nerf unique ne sont pas connus. Nous avançons l'hypothèse qu'il existe des connections axo-axoniques comme il a été démontré dans l'hypothalamus. L'existence hypothétique de synapses électriques formées par les connexins et les gaps junctions et la présence probable de varicosités axonales pourraient affecter la conductance et le processus de codage de l'information. Du fait des limitations techniques (les études électro physiologiques sont inexistantes sur l'aile du fait du manque d'accessibilité des neurones protégées par la couche de chitine résistante à tout traitement), ces divers scénarios n'ont pas pu être testés. Des innovations technologiques ont failli à ce jour pour avancer dans les connaissances.

Par ailleurs, nous notons que les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation des récepteurs olfactifs et/ou gustatifs des insectes restent controversés (Ishimoto et al., 2005; Sato et al., 2008; Wicher et al., 2008; Deng et al., 2011). Des auteurs plaident pour l'argument que ces molécules forment des canaux ioniques. D'autres affirment qu'elles sont de la même fabrique que leurs équivalents chez les mammifères (Margolskee, 2002) (Margolskee, 2001) à savoir des récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont l'effet de la transduction est *in fine* l'activation (directe ou indirecte) de la cyclase ou de la phospholipase C. De manière plus surprenante encore, des auteurs ont décrit une inversion de topologie de ces protéines transmembranaires par rapport au plan de la bi-couche lipidique (N-terminal extra cellulaire et C-terminal cytosolique), ce qui empêche probablement la possibilité d'un ancrage pour les protéines G (les loop hydrophiles entre les domaines transmembranaires sont inversées par rapport au plan de la membrane chez la drosophile). Nous constatons que des récepteurs gustatifs chez les insectes n'ont pas de domaine d'ancrage aux protéines G dans leur séquence. Il a été suggéré qu'ils forment une nouvelle catégorie de molécules dont les mécanismes de transduction sont encore assez mystérieux. Par conséquent, ces molécules pourraient répondre à trois scénarios: canaux ioniques, récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui activent indirectement la cyclase et/ou la phospholipase C, ou nouvelle classe de récepteurs dont la signalisation est à ce jour encore

[DISCUSSION]

inconnue. Nos travaux ont montré cependant que l'élévation du calcium directement ou indirectement est la résultante de la fixation des molécules sapides sucrées ou amères. De la même manière nos résultats prouvent qu'une élévation de l'AMP cyclique caractérise la stimulation par les molécules sucrées bien que cet effet puisse résulter d'une activation secondaire d'une isoforme de cyclase dépendante du calcium. Des études supplémentaires ont été effectuées après la soutenance de ma thèse sous la demande des « *reviewers* ». Les résultats de ces expériences sont présentés dans « l'annexe A ».

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les données obtenues durant ce travail de thèse montrent que le système gustatif au niveau de l'aile de drosophile est fonctionnel et répond aux molécules sucrées et aux molécules amères. Le mécanisme d'activation et de transduction du signal reste équivoque, avec des hypothèses controversées: des auteurs suggèrent l'activation la voie ionotropique, d'autres défendent la thèse de la voie métabotropique, d'autres auteurs proposent un mécanisme de transduction qui associe les deux aspects. Nos résultats confirment l'implication de l'AMPc, sans contredire aucune des hypothèses émises dans la littérature. Les tests comportementaux décrits avec la souche sauvage CS et la souche transgénique *Poxn** (sensilles chimiosensorielles transformées en mécanosensorielles), couplés aux données aérodynamiques sur le vol des insectes, nous permettent de conclure à un mécanisme majeur des neurones gustatifs de l'aile dans l'orientation, guidage des trajectoires et plus important encore dans la détection des molécules.

Dans la perspective de poursuivre ce projet, plusieurs axes de travaux peuvent être envisagés :

1. Test des pesticides

Nous pouvons émettre l'hypothèse que des pesticides puissent interférer avec les récepteurs gustatifs de l'aile et par voie de conséquence entraîner des désordres graves quant à l'orientation et le guidage dans le vol. Ces perspectives seront intéressantes à analyser pour questionner les problèmes contemporains des insectes pollinisateurs et leur disparition sans explication dans leur écosystème.

2. Etude d'électrophysiologie ciblant les sensilles gustatives au niveau de l'aile de drosophile

Les résultats obtenus en utilisant la souche transgénique contenant le senseur de calcium (G-CaMP) en microscopie confocale ont montrés la fonctionnalité du système gustatif au niveau de l'aile de drosophile. Malgré l'efficacité de cette technique, les résultats obtenus restent limités et ne permettent pas d'accéder aux mécanismes moléculaires. Les études d'électrophysiologie qui restent à développer et les possibilités de résultats incertains tant les difficultés techniques sont immenses, et nous permettront d'établir une carte illustrant la répartition des sensilles gustatives vis-à-vis des types de molécules auxquelles elles répondent.

3. Test comportemental dans un tunnel de vol

La réalisation des tests comportementaux dans un tunnel de vol nous permettra d'aborder le comportement en trois dimensions. Cette technique nous renseignera sur les mécanismes d'orientation en vol des différentes souches de drosophiles soumises à des stimuli dans un environnement proche de la réalité naturelle.

RÉFÉRENCE

[REFERENCE]

- Akerboom, J., Rivera, J.D.V., Guilbe, M.M.R., Malavé, E.C.A., Hernandez, H.H., Tian, L., Hires, S.A., Marvin, J.S., Looger, L.L., and Schreiter, E.R. (2009). Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem* 284, 6455–6464.
- Amrein, H., and Bray, S. (2003). Bitter-sweet solution in taste transduction. *Cell* 112, 283–284.
- Amrein, H., and Thorne, N. (2005). Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 15, R673–R684.
- Arthaud, L., Rokia-Mille, S.B., Raad, H., Dombrovsky, A., Prevost, N., Capovilla, M., and Robichon, A. (2011). Trade-off between toxicity and signal detection orchestrated by frequency- and density-dependent genes. *PLoS ONE* 6, e19805.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11241–11246.
- Ben Rokia-Mille, S., Tinette, S., Engler, G., Arthaud, L., Tares, S., and Robichon, A. (2008). Continued neurogenesis in adult *Drosophila* as a mechanism for recruiting environmental cue-dependent variants. *PLoS ONE* 3, e2395.
- Benayoun, M., Cowan, J.D., van Drongelen, W., and Wallace, E. (2010). Avalanches in a stochastic model of spiking neurons. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000846.
- Bennett, M.V.L., and Zukin, R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* 41, 495–511.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W., and Vosshall, L.B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol* 4, e20.
- Benton, R., Vannice, K.S., Gomez-Diaz, C., and Vosshall, L.B. (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136, 149–162.
- Blair, S.S. (2003). Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development* 130, 5065–5072.
- Blair, S.S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 293–319.
- Boll, W., and Noll, M. (2002). The *Drosophila* Pox neuro gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development* 129, 5667–5681.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Bray, S., and Amrein, H. (2003). A putative *Drosophila* pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron* 39, 1019–1029.
- Cameron, P., Hiroi, M., Ngai, J., and Scott, K. (2010). The molecular basis for water taste in *Drosophila*.

[REFERENCE]

Nature 465, 91–95.

Clyne, P.J., Warr, C.G., and Carlson, J.R. (2000). Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* 287, 1830–1834.

Clyne, P.J., Warr, C.G., Freeman, M.R., Lessing, D., Kim, J., and Carlson, J.R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22, 327–338.

Couso, J.P., Bishop, S.A., and Martinez Arias, A. (1994). The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* 120, 621–636.

Couto, A., Alenius, M., and Dickson, B.J. (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol* 15, 1535–1547.

Dahanukar, A., Foster, K., van der Goes van Naters, W.M., and Carlson, J.R. (2001). A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nat Neurosci* 4, 1182–1186.

Dahanukar, A., Lei, Y.-T., Kwon, J.Y., and Carlson, J.R. (2007). Two Gr genes underlie sugar reception in *Drosophila*. *Neuron* 56, 503–516.

de Bruyne, M., and Warr, C.G. (2006). Molecular and cellular organization of insect chemosensory neurons. *Bioessays* 28, 23–34.

Debanne, D. (2004). Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci* 5, 304–316.

Deng, Y., Zhang, W., Farhat, K., Oberland, S., Gisselmann, G., and Neuhaus, E.M. (2011). The stimulatory Gα(s) protein is involved in olfactory signal transduction in *Drosophila*. *PLoS ONE* 6, e18605.

Dethier, V.G. (1972). Sensitivity of the contact chemoreceptors of the blowfly to vapors. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2189–2192.

Dethier, V.G., and Goldrich-Rachman, N. (1976). Anesthetic stimulation of insect water receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3315–3319.

Dickinson, M. (2006). Insect flight. *Curr Biol* 16, R309–R314.

Dickinson, M.H., Lehmann, F.O., and Sane, S.P. (1999). Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. *Science* 284, 1954–1960.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151–156.

Dunipace, L., Meister, S., McNealy, C., and Amrein, H. (2001). Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Curr Biol* 11, 822–835.

Ferguson, G.D., and Storm, D.R. (2004). Why calcium-stimulated adenylyl cyclases? *Physiology (Bethesda)* 19, 271–276.

[REFERENCE]

- Fischler, W., Kong, P., Marella, S., and Scott, K. (2007). The detection of carbonation by the *Drosophila* gustatory system. *Nature* *448*, 1054–1057.
- Fishilevich, E., and Vosshall, L.B. (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol* *15*, 1548–1553.
- Fishilevich, E., Domingos, A.I., Asahina, K., Naef, F., Vosshall, L.B., and Louis, M. (2005). Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* *15*, 2086–2096.
- Gao, Q., and Chess, A. (1999). Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics* *60*, 31–39.
- Gendre, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G.M., and Stocker, R.F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development* *131*, 83–92.
- Gerber, B., and Stocker, R.F. (2006). The *Drosophila* Larva as a Model for Studying Chemosensation and Chemosensory Learning: A Review. *Chem Senses* *32*, 65–89.
- Godunko, R., Staniczek, A., and Bechly, G. (2011). Coxoplectoptera, a new fossil order of Palaeoptera (Arthropoda: Insecta), with comments on the phylogeny of the stem group of mayflies (Ephemeroptera). *Insect Systematics & Evolution* *42*, 101–138.
- Goldman, A.L., van der Goes van Naters, W., Lessing, D., Warr, C.G., and Carlson, J.R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* *45*, 661–666.
- Grimaldi, D.A., and Engel, M.S. (2005). *Evolution of the Insects*.
- Hallem, E.A., and Carlson, J.R. (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* *125*, 143–160.
- Hallem, E.A., Ho, M.G., and Carlson, J.R. (2004). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* *117*, 965–979.
- Hartenstein, V., and Posakony, J.W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* *107*, 389–405.
- Hiroi, M., Meunier, N., Marion-Poll, F., and Tanimura, T. (2004). Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J Neurobiol* *61*, 333–342.
- Inoshita, T., and Tanimura, T. (2006). Cellular identification of water gustatory receptor neurons and their central projection pattern in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* *103*, 1094–1099.
- Ishimoto, H., Takahashi, K., Ueda, R., and Tanimura, T. (2005). G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*. *Embo J* *24*, 3259–3265.
- Jiao, Y., Moon, S.J., and Montell, C. (2007). A *Drosophila* gustatory receptor required for the responses to sucrose, glucose, and maltose identified by mRNA tagging. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 14110–14115.
- Jiao, Y., Moon, S.J., Wang, X., Ren, Q., and Montell, C. (2008). Gr64f is required in combination with

[REFERENCE]

- other gustatory receptors for sugar detection in *Drosophila*. *Curr Biol* 18, 1797–1801.
- Jones, W.D., Cayirlioglu, P., Kadow, I.G., and Vosshall, L.B. (2007). Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445, 86–90.
- Kamikouchi, A., Shimada, T., and Ito, K. (2006). Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 499, 317–356.
- Kent, L.B., and Robertson, H.M. (2009). Evolution of the sugar receptors in insects. *BMC Evol Biol* 9, 41.
- Kinnamon, S.C. (2000). A plethora of taste receptors. *Neuron* 25, 507–510.
- Kinnamon, S.C. (2012). Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 158–168.
- Kwon, J.Y., Dahanukar, A., Weiss, L.A., and Carlson, J.R. (2007). The molecular basis of CO₂ reception in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3574–3578.
- Laughlin, J.D., Ha, T.S., Jones, D.N.M., and Smith, D.P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133, 1255–1265.
- Lee, Y., Moon, S.J., and Montell, C. (2009). Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4495–4500.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature* 413, 219–225.
- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Burton, H.R., Andersen, R.A., and Hildebrand, D.F. (1992). Glycosidically bound volatile components of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens* flowers. *Phytochemistry* 31, 1537–1540.
- Margolskee, R.F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem* 277, 1–4.
- Marin, E.C., Watts, R.J., Tanaka, N.K., Ito, K., and Luo, L. (2005). Developmentally programmed remodeling of the *Drosophila* olfactory circuit. *Development* 132, 725–737.
- Martin, J.-R., Rogers, K.L., Chagneau, C., and Brûlet, P. (2007). In vivo bioluminescence imaging of Ca signalling in the brain of *Drosophila*. *PLoS ONE* 2, e275.
- Medler, K.F. (2010). Calcium signaling in taste cells: regulation required. *Chem Senses* 35, 753–765.
- Meunier, N., Marion-Poll, F., and Lucas, P. (2009). Water taste transduction pathway is calcium dependent in *Drosophila*. *Chem Senses* 34, 441–449.
- Mitchell, B.K. (1999). Peripheral and Central Structures Involved in Insect Gustation. 1–15.
- Miyamoto, T., and Amrein, H. (2008). Suppression of male courtship by a *Drosophila* pheromone receptor. *Nat Neurosci* 11, 874–876.
- Montell, C. (2009). A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Curr Opin Neurobiol* 19, 345–353.

[REFERENCE]

- Murakami, M., and Kijima, H. (2000). Transduction ion channels directly gated by sugars on the insect taste cell. *J. Gen. Physiol.* *115*, 455–466.
- Nakagawa, T., and Vosshall, L.B. (2009). Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* *19*, 284–292.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* *19*, 137–141.
- Neuhaus, E.M., Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Störtkuhl, K., and Hatt, H. (2005). Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* *8*, 15–17.
- Nottebohm, E., Dambly-Chaudière, C., and Ghysen, A. (1992). Connectivity of chemosensory neurons is controlled by the gene *poxn* in *Drosophila*. *Nature* *359*, 829–832.
- Ozaki, M., Takahara, T., Kawahara, Y., Wada-Katsumata, A., Seno, K., Amakawa, T., Yamaoka, R., and Nakamura, T. (2003). Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: putative role of an odorant-binding protein. *Chem Senses* *28*, 349–359.
- Price, P.W. (1984). *Insect Ecology*.
- Python, F.O., and Stocker, R.F. (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J Comp Neurol* *445*, 374–387.
- Ramaekers, A., Magnenat, E., Marin, E.C., Gendre, N., Jefferis, G.S.X.E., Luo, L., and Stocker, R.F. (2005). Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Curr Biol* *15*, 982–992.
- Rhoads, A.R., and Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* *11*, 331–340.
- Sane, S.P. (2003). The aerodynamics of insect flight. *J Exp Biol* *206*, 4191–4208.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., and Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* *452*, 1002–1006.
- Sato, K., Tanaka, K., and Touhara, K. (2011). Sugar-regulated cation channel formed by an insect gustatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 11680–11685.
- Scaloni, A., Monti, M., Angeli, S., and Pelosi, P. (1999). Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* *266*, 386–391.
- Schmitz, D., Schuchmann, S., Fisahn, A., Draguhn, A., Buhl, E.H., Petrasch-Parwez, E., Dermietzel, R., Heinemann, U., and Traub, R.D. (2001). Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron* *31*, 831–840.
- Scott, K., Brady, R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., and Axel, R. (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* *104*, 661–673.

[REFERENCE]

- Shadlen, M.N., and Movshon, J.A. (1999). Synchrony unbound: a critical evaluation of the temporal binding hypothesis. *Neuron* 24, 67–77, 111–125.
- Silbering, A.F., and Benton, R. (2010). Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: 'chance or design'? *EMBO Rep* 11, 173–179.
- Singer, W. (1999). Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron* 24, 49–65, 111–125.
- Singh, R.N. (1997). Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects. *Microsc Res Tech* 39, 547–563.
- Smart, R., Kiely, A., Beale, M., Vargas, E., Carraher, C., Kralicek, A.V., Christie, D.L., Chen, C., Newcomb, R.D., and Warr, C.G. (2008). *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 770–780.
- Stocker, R.F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res*. 275, 3–26.
- Thorne, N., and Amrein, H. (2008). Atypical expression of *Drosophila* gustatory receptor genes in sensory and central neurons. *J Comp Neurol* 506, 548–568.
- Thorne, N., Chromey, C., Bray, S., and Amrein, H. (2004). Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr Biol* 14, 1065–1079.
- Tsuchihara, K., Fujikawa, K., Ishiguro, M., Yamada, T., Tada, C., Ozaki, K., and Ozaki, M. (2005). An odorant-binding protein facilitates odorant transfer from air to hydrophilic surroundings in the blowfly. *Chem Senses* 30, 559–564.
- Ueno, K., Kohatsu, S., Clay, C., Forte, M., Isono, K., and Kidokoro, Y. (2006). Gsalpha is involved in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 26, 6143–6152.
- Ueno, K., Ohta, M., Morita, H., Mikuni, Y., Nakajima, S., Yamamoto, K., and Isono, K. (2001). Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene Gr5a. *Curr Biol* 11, 1451–1455.
- Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P.S., Rzhetsky, A., and Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96, 725–736.
- Vosshall, L.B., and Stocker, R.F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* 30, 505–533.
- Vosshall, L.B., Wong, A.M., and Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147–159.
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P., and Scott, K. (2004). Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell* 117, 981–991.

[REFERENCE]

Weiss, L.A., Dahanukar, A., Kwon, J.Y., Banerjee, D., and Carlson, J.R. (2011). The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* 69, 258–272.

Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H., and Hansson, B.S. (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452, 1007–1011.

Wilson, R.I., and Laurent, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurosci* 25, 9069–9079.

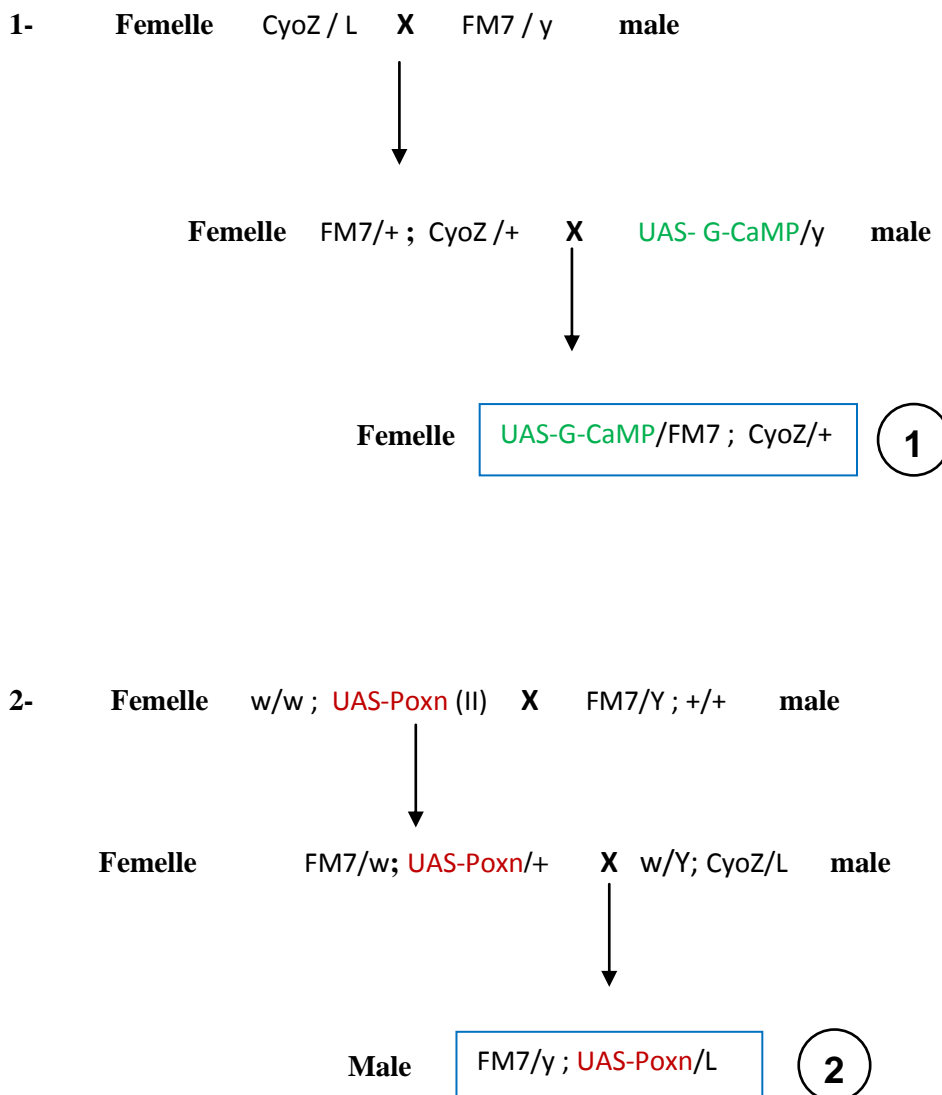
Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293–301.

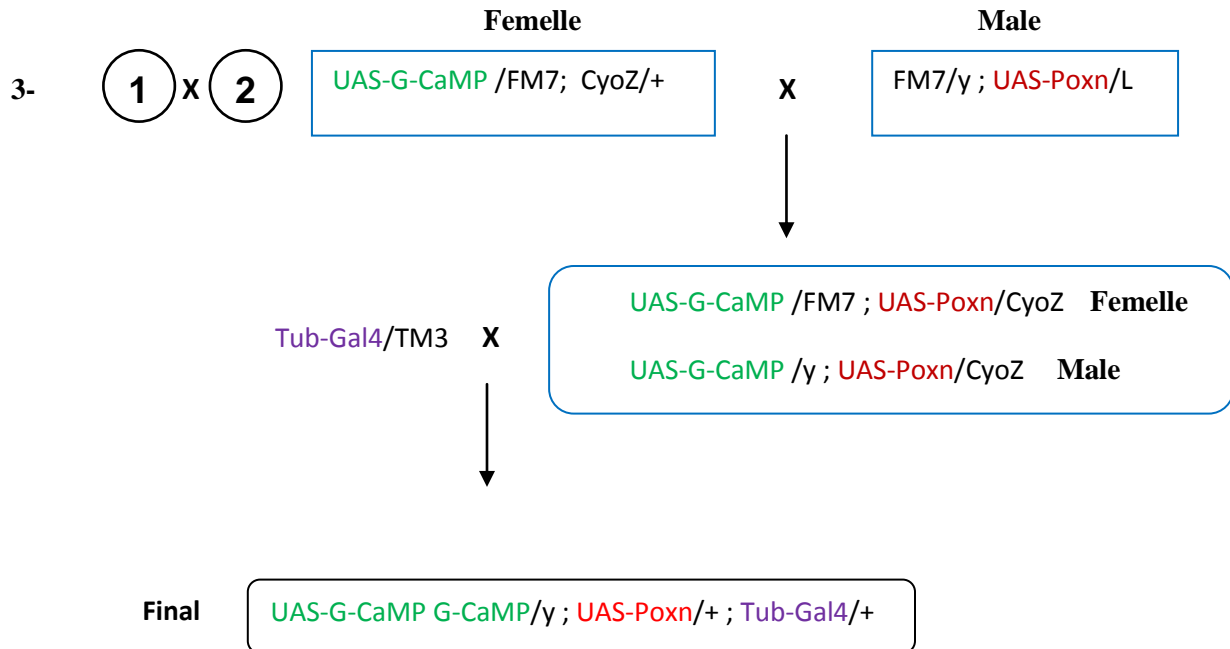
ANNEXE A

1. Stimulation du système neuronal des ailes du transgène « *G-CaMP/y* ; *UAS-Poxn/+* ; *Tub-Gal4/+* ».

Des croisements ont été réalisés dans le but d'obtenir une souche qui porte le gène *poxneuro* nul en même temps qu'elle exprime le senseur de calcium sous le contrôle de *Tub-Gal4*. Cette construction nous permet d'établir un contrôle négatif de l'induction de piques de calcium par les molécules sapides dans l'aile. La souche transgénique a été obtenue par une série des croisements décrite ci-dessous.

Schéma des croisements :





Résultats

Glucose 100 mM: *tub-Gal/UAS RNAi poxn/ UAS G-CaMP*

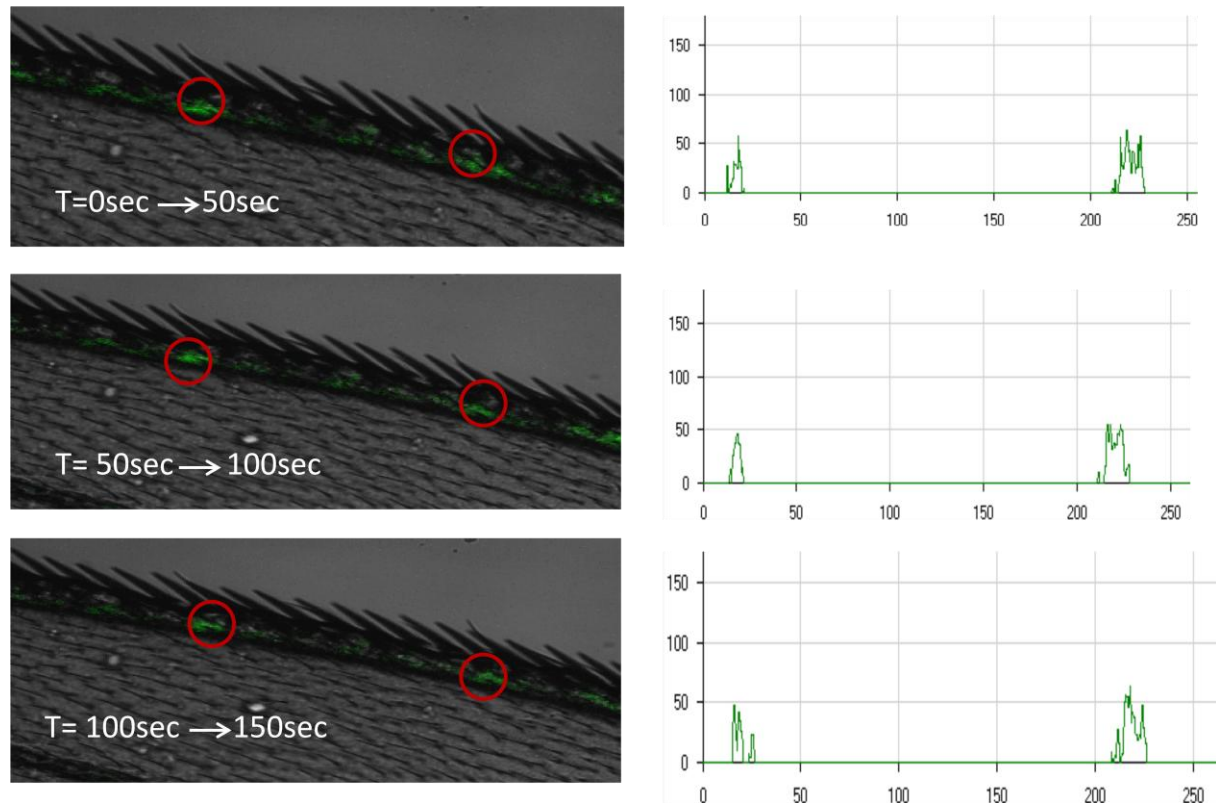


Figure A1. Fluorescence in the wing margin nerve of the mutant (*Tub-Gal4/ UAS RNAi poxn/ UAS G-CaMP*) after glucose treatment. The intensity of light is quantified in individual spots (red circles) in a sequential mode (from $t = 0$ s to $t = 150$ s) during the confocal microscopy recording.

denatonium 50mM: *tub-Gal/UAS RNAi poxn/ UAS G-CaMP*

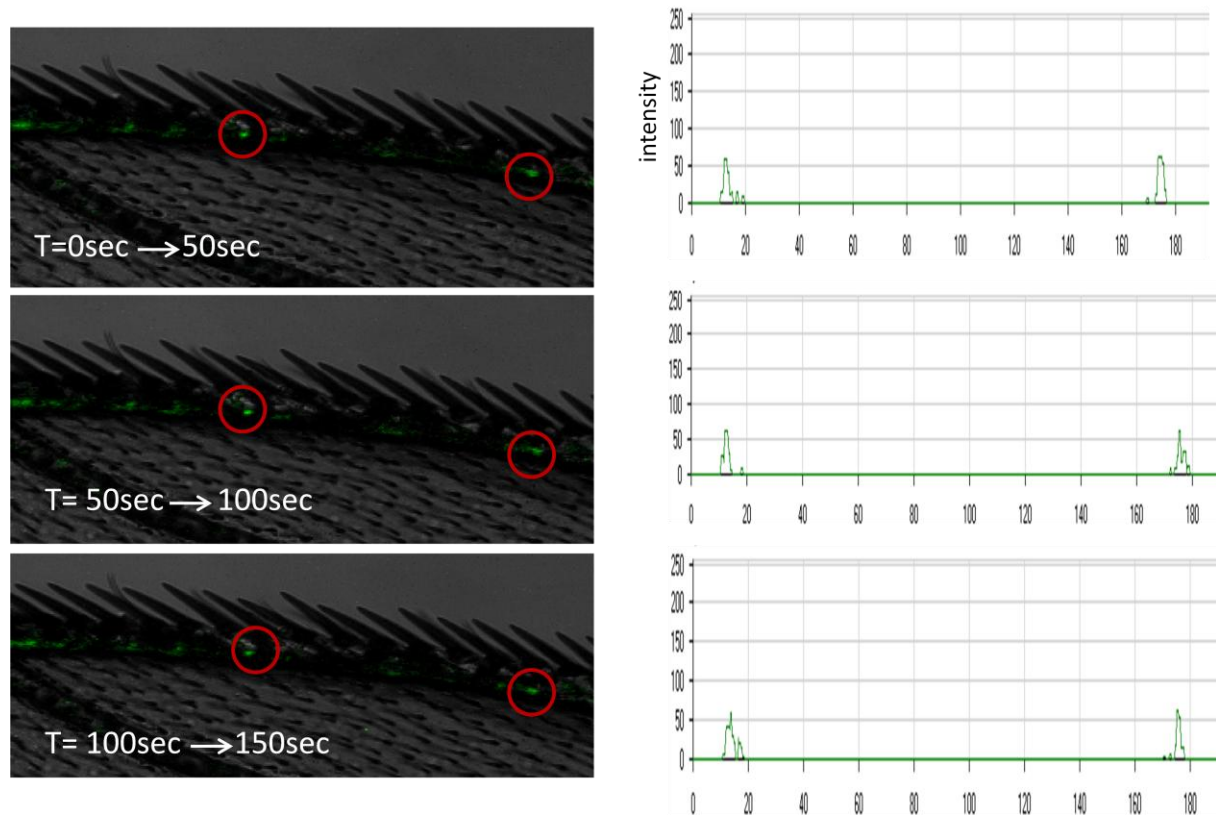
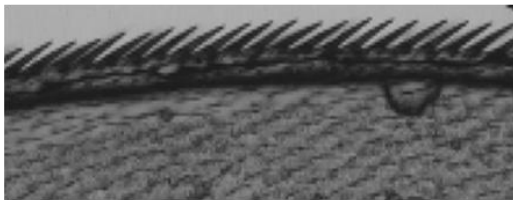


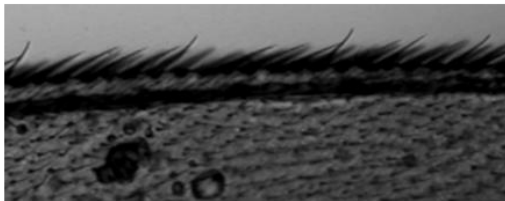
Figure A2. Fluorescence in the wing margin nerve of the mutant (*Tub-Gal4/ UAS RNAi poxn/ UAS G-CaMP*) after denatonium treatment. The intensity of light is quantified in individual spots (red circles) in a sequential mode (from $t = 0$ s to $t = 150$ s) during the confocal microscopy recording.

2. Phénotypes des poils de la bordure antérieure des ailes des drosophiles pour la souche sauvage et le mutant « *Gal4 (6791) / UAS RNAi poxn* »

Wing gustatory sensilla genetic ablation



Gal4 (6791) / UAS RNAi poxn



CS

Figure A3. Phenotypes of wings bristles of wild type and (*Gal4 (6791) / UAS RNAi pox*) mutant. Bristles on the anterior wing margin are compared using a confocal microscope “ZEISS LSM 510 META” at a resolution of 20X magnification.

3. Expression de Poxn et de Gr64f chez la drosophile m. melanogaster (aile et tête)

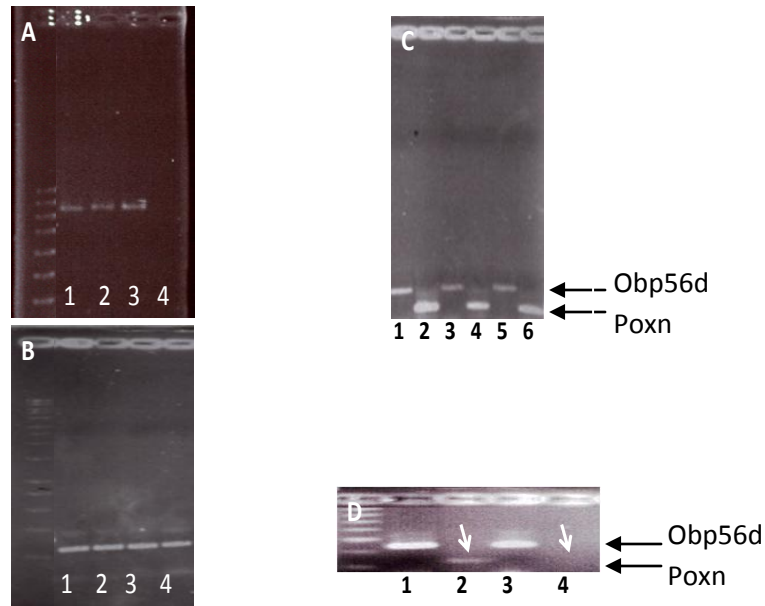


Figure A4. (A) Comparison of the expression of Gr64f between the wing and the head of wild type drosophila vs the mutant “*Wing-Gal4> UAS-Poxn RNAi*”. (B) Represent the expression of the control “Obp 56d”. (1) cDNA “CS, head”, (2) cDNA “*Wing-Gal4> UAS-Poxn RNAi*, head”, (3) cDNA “CS, wing”, (4) cDNA “*Wing-Gal4> UAS-Poxn RNAi*, wing”. (C) RT-PCR analysis of the expression of Poxn and the control Obp 56d in the embryo of different mutant of drosophila. (1, 2 Wild type), (3, 4 *UAS-Poxn RNAi*), (5, 6 *Wing-Gal4> UAS-Poxn RNAi*). (D) RT-PCR analysis of the expression of Poxn and the control Obp 56d in the wing of adult drosophila “wild type vs the mutant (*Wing-Gal4> UAS-Poxn RNAi*)”.